

Universidade Estadual de Campinas

MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

**Anisotropias ópticas em feixes de colágeno e pesquisa
de morte celular em fibroblastos de tendões durante o
estabelecimento do diabetes espontâneo em
camundongos não-obesos (NOD)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e Estrutural na área de:
Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 27 de Agosto de 2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal (Orientador)

(Assinatura)

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

(Assinatura)

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

(Assinatura)

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

(Assinatura)

“O Homem sempre deve navegar para lugares que não conhece, pois só assim ele destrói a arrogância que o torna professor e doutor de coisas que nunca viu”.

(Amir Klink)

AGRADECIMENTOS

À *DEUS* por todas as bênçãos que me concedeu e por ter me premiado com saúde, perseverança, paciência e coragem para superar os desafios e dificuldades que encontrei ao longo deste trabalho.

Aos meus pais Marcelino e Maria de Lourdes e ao meu irmão Rodrigo pelo apoio financeiro e emocional, por terem entendido e relevado com muita paciência meus momentos de mau-humor e estresse e, principalmente, por nunca terem medido esforços para realizar meus desejos e transformar todos os meus sonhos em uma feliz realidade.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal e a Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello por terem dividido comigo uma parte de seus vastos conhecimentos, pela confiança em meu trabalho e ensinamentos de vida.

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pela oportunidade acadêmica, confiança em meu trabalho, disponibilidade em ouvir meus desabafos, pré-banca, por ter entendido e apoiado a minha escolha e principalmente pela amizade.

Aos professores Evanisi Teresa Palomari e Antônio Carlos Boschero pelas valiosas sugestões durante o exame prévio deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Astride Saad Corradi pela amizade, pelas belas atitudes que devem ser tomadas como exemplos de vida a serem seguidos e por ter sido a primeira a me despertar a enorme paixão que sinto pela Biologia Celular.

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza pelo incentivo em uma das escolhas mais difíceis e decisivas da minha vida.

À todos os professores do Departamento de Biologia Celular, em especial ao Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel pela amizade e grandeza de seu bom caráter.

À todos os ex-professores que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional.

Ao técnico Mário Bianchi pela ajuda experimental.

À Lílian e ao Sidnei (secretaria do Departamento de Biologia Celular) pelo auxílio em questões envolvendo prazos, normas e congressos.

À todos os meus amigos de São José do Rio Preto que apesar de distantes nunca se esqueceram de colocar meu nome em suas orações.

Às minhas amigas/irmãs: Carina, Christiane, Daniela, Elisângela, Legilane, Maira, Rafaela e Roberta por terem sido as pessoas que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Aos meus amigos de laboratório: Antonella, Flávia, Alberto, Juliano, Maristela, André e Rafael pelo convívio, ajuda, amizade, sugestões e por terem pacientemente “aturado” meus momentos de estresse.

Às minhas amigas do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural: Azize, Fernanda, Gisele, Glaura, Josete, Lúcia e Tatiana pelas conversas divertidas.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e ao Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas da UNICAMP (CEMIB) pelo fornecimento dos camundongos NOD/Uni e BALB/C/Uni.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela cuidadosa revisão “do inglês” do segundo capítulo deste trabalho.

Ao CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

“Dedico este trabalho à todos que sempre me apoiaram e torceram para que eu conseguisse vencer mais essa tão desejada etapa de minha vida”.

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	29
CAPÍTULOS.....	30
CAPÍTULO 1.....	31
Cristalinidade e estado de agregação ordenada em feixes de colágeno de tendões de camundongos diabéticos não-obesos.....	32
Abreviações e Símbolos.....	33
Resumo.....	36
1.Introdução.....	38
2. Objetivos.....	42
3. Material e Métodos.....	43
4. Resultados.....	49
5. Discussão.....	55
6. Bibliografia.....	73
Tabelas.....	85
Gráficos.....	90
Legenda das Figuras.....	94
Figuras.....	96

Legenda dos Anexos.....	100
Anexos.....	101
CAPÍTULO 2.....	103
Nuclear phenotype and cell death in tendons fibroblasts of non-obese diabetic (NOD) mice.....	104
Abstract.....	105
1. Introduction.....	106
2. Material and Methods.....	107
3. Results.....	111
4. Discussion and Conclusion.....	112
5. Acknowledgements.....	114
6. References.....	115
Table 1.....	119
Figure Captions.....	120
Figure 1.....	121
Figure 2.....	122
CONCLUSÕES GERAIS.....	123
REFERÊNCIAS GERAIS.....	126

ABREVIações

AGEs	Produtos de glicosilação avançada (“Advanced glycosilation endproducts”)
B	Birrefringência
B.I.	Birrefringência intrínseca
B.F.	Birrefringência de forma
Ca ²⁺	Íons cálcio
ConA	Concanavalina A
ConBr	Concanavalina Br (“ Concanavalin Br”)
D.C.	Dicroísmo circular
D.L.	Dicroísmo linear
DNA	Ácido desoxirribonucléico (“Deoxyribonucleic acid”)
ECM	Extracellular matrix
GAGs	Glicosaminoglicanos
IOD	Densidade óptica integrada (“Integrated optical density”)
MEC	Matriz extracelular
n	Índice de refração
nm	Nanômetros
NOD	Diabéticos não-obesos (“Non-obese diabetic”)
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio de uma solução
OD	Densidade óptica (“Optical density”)

OR	Optical retardation
PGs	Proteoglicanos (Proteoglycans)
RAGE	Receptor para produtos de glicosilação avançada
RO	Retardo óptico
SDtd	Desvio padrão dos valores densitométricos totais por núcleo
TB	Toluidine blue
λ	Comprimento de onda

RESUMO

Camundongos NOD são ótimos modelos para estudo, uma vez que são portadores de duas importantes características: diabetes e resistência à apoptose. É desconhecido se a elevada resistência à apoptose atinge células somente do sistema imune onde foi descrita, ou se é uma característica de células de outros sistemas/tecidos. O *diabetes mellitus* provoca alterações na matriz extracelular (MEC) por meio da glicosilação não-enzimática das proteínas intercelulares, tal como o colágeno. No processo não-enzimático de glicosilação da proteína colagênica, o grupo aldeído da glicose reage com o grupamento amina livre de resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno, formando uma base Schiff reversível que origina os produtos de Amadori. Estes produtos dão origem aos produtos de glicosilação avançada (AGEs) que desencadeiam a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. O colágeno interage com receptores de superfície celular de modo que alterações nesta glicoproteína poderiam alterar a transdução de sinais da MEC para as células. O presente estudo visa descrever e quantificar as propriedades anisotrópicas ópticas em feixes de colágeno; buscar alterações elicítadas pelo diabetes nos proteoglicanos (PGs) da MEC; verificar a ocorrência de resíduos de glicose disponíveis no colágeno glicosilado; descrever o intumescimento e a extração de feixes de colágeno em ácido acético a 3% e comparar alguns aspectos da morte celular e do fenótipo nuclear de fibroblastos de feixes de colágeno de camundongos saudáveis e NOD, buscando-se alterações elicítadas pelo diabetes. Para isso, tendões do calcâneo e da cauda de

camundongos NOD e BALB/C (não-diabéticos) foram submetidos aos seguintes experimentos: Medidas de retardo óptico (RO) das birrefringências; digestão enzimática com hialuronidase testicular; colorações com azul de toluidina (AT) pH 4.0 e concanavalina Br (ConBr); intumescimento e extração do colágeno; reação de Feulgen, análise de imagem nuclear e teste imunocitoquímico de TUNEL.

Os resultados indicam que toda a glicose incorporada não-enzimaticamente ao colágeno foi convertida a produtos de Amadori. O aumento no número de ligações cruzadas intermoleculares tornou as fibras de colágeno mais alinhadas, estáveis e com condições de empacotamento molecular mais intensas em relação às fibras de colágeno controle. A estabilidade torna o colágeno glicosilado mais resistente à extração por ácido acético a 3% e sugere a ocorrência de diminuição na taxa de remodelação tecidual de animais e/ou pacientes diabéticos. Em termos de ordem molecular (cristalinidade) dos feixes de colágeno, parece que o diabetes induz mudanças variáveis em função da estrutura, fato este que sugere a existência de significados fisio-patogênicos distintos. Quanto aos PGs da MEC, não foram observadas alterações elicitadas pelo diabetes nestas macromoléculas. Os parâmetros geométricos e densitométricos que caracterizam o fenótipo nuclear dos fibroblastos também foram alterados pelo diabetes, sendo que encontrou-se um aumento desses parâmetros ao compará-los com os observados em núcleos de fibroblastos de camundongos não-diabéticos. Não foi constatada positividade ao teste de TUNEL nos núcleos dos fibroblastos estudados.

ABSTRACT

NOD mice possess two characteristics: diabetes and resistance to various apoptosis signals. *Diabetes mellitus* provokes alterations in the extracellular matrix (ECM) through of the non-enzymatic glycosylation of intercellular proteins, such as the collagen. In the process of non-enzymatic glycosylation of the collagen protein, the carbonyl group of a sugar reacts with the amino group of a protein and forms a Schiff's base which reacts further into a Amadori products. The products of early glycosylation undergo rearrangements resulting in the formation of irreversible products, the so-called advanced glycosylation endproducts (AGEs).

AGEs formation is probably one of the main mechanisms underlying the increased arterial stiffness in diabetic patients or diabetic complications in general.

The collagen interacts with cell receptors, consequently alterations in the collagen can change the signal transduction from ECM for the cells. The principal objectives of present study are: to describe the anisotropic properties of collagen bundles obtained from NOD mice and to compare some aspects of the cell death and nuclear phenotype of fibroblasts obtained from NOD and BALB/C mice.

For this, calcaneal and tail tendons were submitted to the following experiments: measurements of intrinsic and textural birefringence; enzymatic digestion; staining with toluidine blue (TB) pH 4.0; Concanavalin Br method; collagen extraction; Feulgen reaction, analysis of nuclear images and TUNEL test.

The results indicate that all glucose was converted the Amadori products. The increase in the number of cross-linking becomes the collagen fibers both more

aligned and with more intense molecular packing conditions than those of the control. In terms of molecular order (crystallinity) of collagen bundles, the diabetes induces variable changes in function of the structure, fact this that suggests the existence of different physio-pathogenics meanings. The analysis of parameters that characterize the nuclear phenotype (area, perimeter, OD, IOD, SDtd and entropy) indicate physiological differences between the fibroblasts obtained from NOD and BALB/C mice. The reply to the TUNEL test was negative in the fibroblasts.

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* provoca alterações estruturais e químicas na matriz extracelular (MEC), comprometendo sua homeostasia e, possivelmente, a transdução de sinais para as células (Zatecka et al., 2003).

A incorporação de glicose às proteínas intracelulares e às proteínas da MEC é um dos principais fatores responsáveis pelas alterações clínicas (disfunções orgânicas) observadas no *diabetes mellitus* (Bishara et al., 2002; Mentink et al., 2002). Essa via atípica de incorporação da glicose independe de um mecanismo enzimático de caráter fisiológico e, geralmente, é referida como glicosilação não-enzimática de proteínas (Bailey et al., 1998) ou reação Maillard (Reddy et al., 2002).

A glicosilação não-enzimática aparentemente é mais significativa em proteínas que possuem longo período de atividade biológica, como por exemplo, o colágeno. Estudos anteriores mostraram que a glicosilação do colágeno aumenta com o avançar da idade, ocasionando uma série de efeitos deletérios que provavelmente desempenham uma importante função nas patologias do envelhecimento (Schnider & Kohn, 1982; Monnier, 1989; Paul & Bailey, 1996). Em pacientes diabéticos, estes efeitos são acelerados devido à hiperglicemia e correspondem às causas principais da morbidade e mortalidade prematura destes indivíduos (Diabetes Control and Complications Trial, 1993).

No processo não-enzimático de glicosilação da proteína colagênica, o grupo aldeído da glicose reage com o grupamento amina livre de resíduos de lisina e

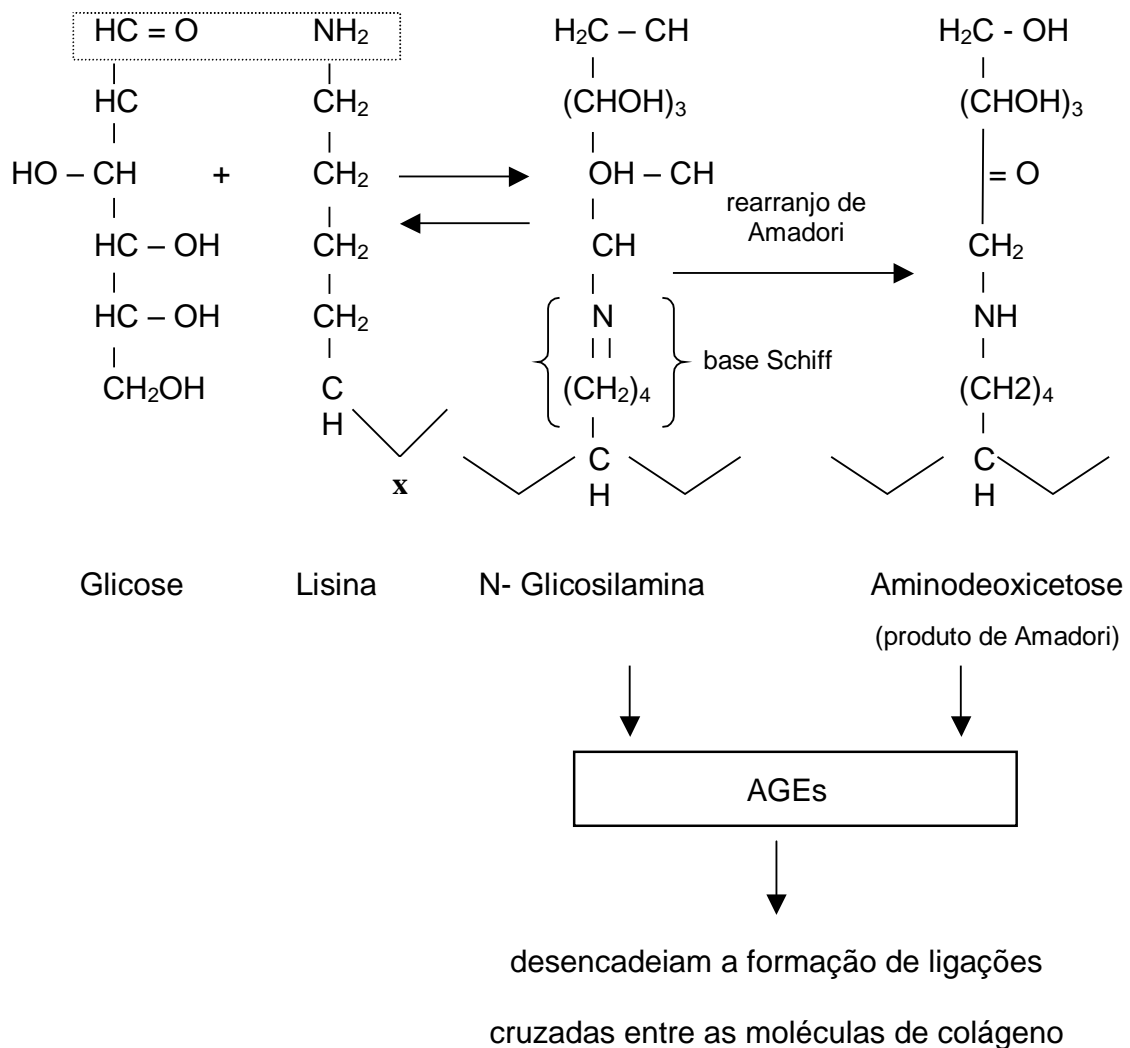
hidroxilisina do colágeno, formando uma base Schiff reversível que origina um produto de Amadori. Este produto origina compostos irreversíveis denominados produtos de glicosilação avançada – AGEs (Esquema 1, pp.20) – que desencadeiam a formação de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno (Andreassen et al., 1988; Brownlee et al., 1988; Vlassara, 1994; Bailey et al., 1998; Singh et al., 2001; Mentink et al., 2002). A descoberta que o envelhecimento provoca acúmulo de pentosidinas na MEC humana foi a primeira evidência molecular para o envolvimento de açúcares reduzidos nas ligações cruzadas de proteínas (Reishner et al., 1998).

As ligações cruzadas diminuem a flexibilidade e a permeabilidade dos tecidos (Bailey et al., 1998) e, provavelmente, são as causas principais do endurecimento de artérias em pacientes diabéticos (Mentink et al., 2002). Não foram encontrados na literatura registros, considerando a hipótese de que alguns resíduos da glicose incorporada possam não ser convertidos a produtos de Amadori, permanecendo disponíveis no colágeno glicosilado não-enzimaticamente. Sabe-se que em cortes de intestino, cartilagem e tendão, o método topoquímico para verificação de resíduos livres de α -D-glicose, usando concanavalina A (lectina que tem afinidade por manose e glicose, respectivamente) e peroxidase de rábano silvestre, só foi significativamente positivo quando os cortes foram submetidos a um tratamento prévio com papaína (enzima que digere o core protéico dos proteoglicanos da MEC). Este fato sugere a existência de produtos removíveis pela papaína interagindo com resíduos

laterais de carboidratos das moléculas de colágeno ou causando algum bloqueio estérico como ocorre em regiões com alto estado de compactação (Pimentel & Vidal, 1990).

Há indícios de que a glicosilação não-enzimática ocorra preferencialmente na região de intervalo (“gap”) da fibra de colágeno. Esta área estaria mais acessível à glicose em relação às outras regiões da fibra (Wess et al., 1993). Entretanto, os padrões de banda D das fibras de colágeno dos tendões da cauda de ratos diabéticos não sofrem modificações organizacionais (Odetti et al., 2000).

As propriedades do colágeno após a glicosilação não-enzimática são afetadas em diferentes aspectos, tais como na habilidade para formar agregados supramoleculares (Bailey et al., 1998) e na susceptibilidade à degradação térmica (Hedge et al., 2002). Além disso, o colágeno glicosilado pode atuar como agente oxidante (Bailey et al., 1998). As propriedades de autofluorescência e a agregação cristalina do colágeno em pacientes diabéticos e em animais com diabetes experimental diferem daquelas do colágeno não-glicosilado (Andreassen et al., 1988), sendo que os fibroblastos têm a sua capacidade de produção de metaloproteinases e de contrair um gel de colágeno glicosilado reduzidas (Rittie et al., 1999). A perda de habilidades dos fibroblastos pode ser atribuída a possíveis alterações nos mecanismos de sinalização celular.



Esquema 1: Reação da glicose com a lisina para formar uma base Schiff reversível que espontaneamente sofre um rearranjo para formar o produto de Amadori, aminodeoxicetose. Modificado de A.J. Bailey et al./ Mechanisms of Ageing and Development 106 (1998) 1-56, pp.24. x = cadeia.

Estudos realizados com colágeno tipo I, em tendões do calcâneo de coelhos, em diferentes intervalos de glicosilação *in vitro* (zero, duas, quatro, seis, oito e dez semanas) mostraram que no intervalo de zero a duas semanas o colágeno não apresentava alterações bioquímicas significativas quando comparado ao controle; porém no intervalo de seis a dez semanas, observavam-se nítidas alterações, encontrando-se uma redução na extratibilidade do colágeno e admitindo-se, assim, que o colágeno glicosilado seja mais resistente à colagenase, em relação ao colágeno sadio, em virtude da maior quantidade de ligações cruzadas intermoleculares (Reddy et al., 2002).

Por meio de espectrofotometria foi observado que concentrações elevadas de glicose impediam a reconstituição das fibras de colágeno e estimulavam o catabolismo do colágeno tecidual (Lien et al., 1984). A afirmação de que níveis elevados de glicose estimulam o catabolismo do colágeno tecidual, aparentemente, estaria em contradição com a idéia defendida por inúmeros autores de que as ligações cruzadas estabilizam as fibras de colágeno.

Experimentos nos quais feixes de colágeno de animais sadios foram tratados por hialuronidase testicular (enzima que digere ácido hialurônico e condroitin sulfatos 4 e 6) demonstraram que os glicosaminoglicanos (GAGs) da MEC contribuem significativamente para as propriedades de anisotropia dos mesmos (Vidal, 1964 e 1986). Na literatura não foram encontrados registros, considerando a possibilidade de que a hiperglicemia decorrente do diabetes e/ou a associação do colágeno glicosilado com os proteoglicanos (PGs) da MEC de tendões, possam alterar os PGs. Sabe-se, que em tendões do calcâneo de

camundongos diabéticos obesos, há indícios de diminuição na orientação macromolecular de proteínas da MEC (Mello, comunicação pessoal, 2002). Extrações enzimáticas para a remoção de poliânions da MEC poderiam informar sobre a contribuição destes elementos para as propriedades de anisotropias dos feixes de colágeno glicosilados pelo diabetes. Métodos topoquímicos utilizando-se de corantes apropriados poderiam detectar quais poliânions estariam disponíveis nos feixes glicosilados não-enzimaticamente.

Não há dúvidas, portanto, de que o diabetes altera as propriedades físico-químicas dos feixes de colágeno. No entanto, o assunto requer estudos mais aprofundados, especialmente quanto ao entendimento sobre as relações diabetes – glicosilação não-enzimática – ordem molecular e/ou cristalinidade, o que pode ser obtido com o estudo das propriedades de anisotropias ópticas do colágeno, por meio da microscopia de polarização.

As propriedades de anisotropias ópticas estudadas pela microscopia de polarização são as birrefringências e o dicroísmo linear (D.L.).

A birrefringência é a anisotropia devida à diferença de índices de refração do objeto, o que significa propagação de luz com velocidades e direções diferentes. A birrefringência se expressa pela equação $B = n_e - n_o$, na qual n_e = índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário, e n_o = índice de refração na direção do raio ordinário; este raio obedece às leis de refração ($n_o = \frac{\text{seni}}{\text{senr}}$) (Vidal, 1964).

Nas fibras de colágeno, dois tipos de birrefringência podem ser detectados (Vidal, 1964 e 1986): a birrefringência textural ou de forma e a birrefringência intrínseca.

(1) Birrefringência textural ou de forma (B.F.): resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda (λ) com as dimensões da molécula e também com a alternância ordenada da grade molecular (Vidal, 1964 e 1986). As informações sobre a B.F. de um corpo são obtidas por meio de medidas acuradas de retardo óptico ($RO = n_e - n_o \times e$; onde e = espessura do material estudado) efetuadas em meios de embebição com índices crescentes de refração (Vidal, 1964 e 1986).

Para expressar a B.F. de corpos birrefringentes positivos, Wiener (1912) propôs a seguinte equação (Vidal, 1986):

$$n_e^2 - n_o^2 = \frac{S_1 S_2 (n_1^2 + n_2^2)^2}{(1 + S_1) n_2^2 + S_2 n_2^1}$$

onde:

n_1 = índice de refração das micelas que compõem o corpo;

n_2 = índice de refração do meio de embebição;

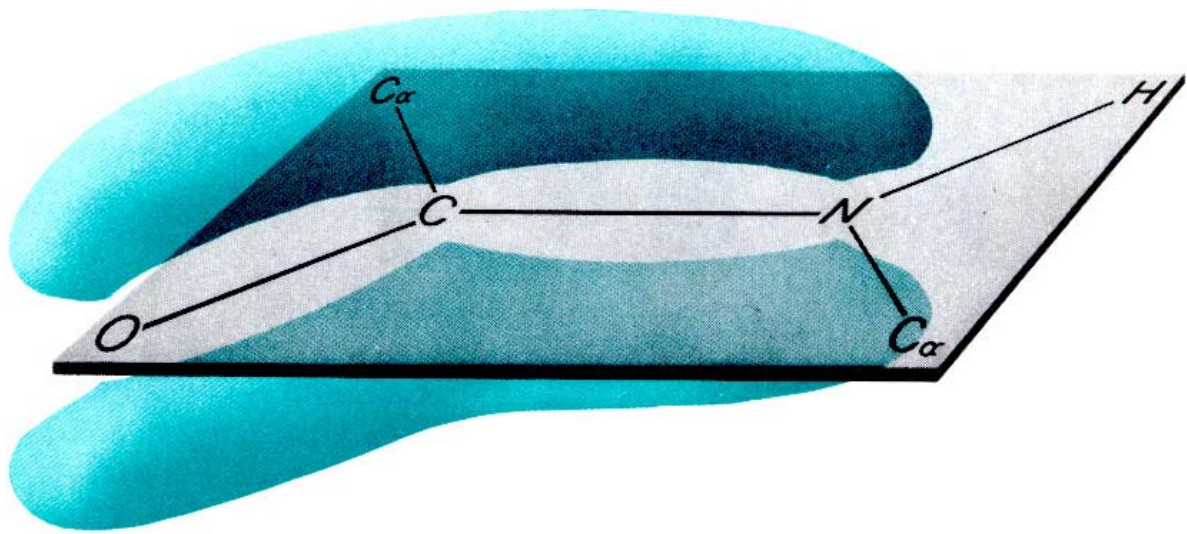
S_1 e S_2 = volumes parciais dos componentes com os índices de refração n_1 e n_2 , respectivamente, de tal modo que: $S_1 + S_2 = 1$;

$n_e^2 - n_o^2$ = constante elétrica para uma dada frequência.

Contudo, a equação de Wiener, não é aplicável aos feixes de colágeno, pois não fornece as variações da birrefringência intrínseca como uma função do solvente, superestimando a contribuição textural (Taylor & Cramer, 1963; Cassim & Taylor, 1965; Oriel & Schellman, 1966; Cassim & Tobias, 1968; Nordén, 1978). Os feixes de colágeno não apresentam um único índice de refração n_1 nem um único volume relativo S_1 devido à sua complexidade em composição e interações moleculares. Os GAGs contribuem significativamente para a B.F. do colágeno (Vidal, 1963 e 1964; Vidal & Mello, 1970; Mello & Vidal, 1973). Assim, os procedimentos experimentais seriam mais indicados para expressá-la.

(2) Birrefringência intrínseca (B.I.): deve-se a transições de elétrons nas ligações peptídicas planares (Esquema 2, pp.25) ao longo do eixo das fibras de colágeno (Cassim & Tobias, 1968; Vidal, 1964 e 1986; Vidal, 1987). No caso da birrefringência intrínseca, o índice de refração (n) pode ser descrito como uma função da polarizabilidade dos elétrons que transitam nas ligações peptídicas planares da molécula de colágeno, i.e., um campo de força externo, tal como a luz que é um campo eletromagnético, influencia no deslocamento da nuvem eletrônica situada nas ligações peptídicas. Este deslocamento responde pelo arranjo espacial dos elétrons na molécula de colágeno e, conseqüentemente, determina a velocidade e a direção na qual a luz se propagará (Vidal, 1987).

A B.F. mais a B.I. informam sobre a birrefringência total dos feixes de colágeno (Vidal, 1987).



Esquema 2: Ligação peptídica planar situada ao longo do eixo longitudinal das fibras de colágeno, cujas transições eletrônicas respondem pela birrefringência intrínseca. Traduzido de R.E. Dickerson e I. Geis/The Structure and Action of Proteins (1969) 1-120, pp.12.

O dicroísmo linear (D.L.) manifesta-se em corpos que absorvem a luz polarizada diferentemente na dependência da direção de seu grupo cromofórico em relação ao azimute do vetor elétrico. Quando a luz polarizada incide sobre a região cromofórica da molécula, cujos elétrons estejam vibrando em um plano que coincida com o azimute do vetor elétrico, ocorre um máximo de absorção da luz polarizada. As estruturas biológicas, geralmente, são desprovidas de grupos cromofóricos que apresentem D.L. detectável em espectro visível, sendo que o colágeno exhibe D.L. somente em luz ultravioleta (190-200 nm), devido às mesmas ligações peptídicas planares que respondem pela birrefringência intrínseca. Dessa forma, são observados fenômenos de D.L. extrínsecos, de maneira similar ao que ocorre em fenômenos de dicroísmo circular (D.C.) extrínsecos (Vidal, 1984).

O uso de novos modelos experimentais pode informar sobre as alterações de anisotropias ópticas elicítadas pelo diabetes nos feixes de colágeno. Atualmente, um modelo que desperta grande interesse por parte dos pesquisadores é a linhagem de camundongos “non-obese diabetic” (NOD) que desenvolve diabetes autoimune, devido à ativação gênica de múltiplos *loci* recessivos e a alterações no mecanismo de morte celular do sistema imune. A porcentagem de células apoptóticas no sistema imune de camundongos da linhagem NOD situa-se entre 4.5 e 18%, enquanto em um outro grupo de camundongos (B6) o percentual situa-se entre 28 e 61.7%. Os animais NOD mostraram-se resistentes a vários fatores que induzem apoptose em outros grupos de camundongos, dentre eles a ciclofosfamida (Colluci et al., 1997). Desta

forma, estes animais podem ser definidos como portadores de duas importantes características: diabetes e resistência à apoptose.

Não foram encontrados registros na literatura, se a elevada resistência à apoptose nos animais NOD é apenas local, ou seja, restrita às células do sistema imune, ou se é também uma característica de células presentes em outros sistemas e/ou tecidos, talvez, apresentando uma relação direta com a alteração na transdução de sinais da MEC para as células, devido à glicosilação das proteínas intercelulares, principalmente do colágeno. Em situação de estresse por hipertermia durante o exercício físico, os tendões de eqüinos sofrem degeneração da porção central, não estando clara, porém, a participação de morte celular dos fibroblastos em tal processo (Birch et al., 1998). A hiperglicemia pode gerar estresse osmótico intracelular devido à atividade de aldose redutase na via sorbitol (Zatecka et al., 2003).

Relatos de que as alterações provocadas pelo diabetes na transdução de sinais do colágeno para os fibroblastos podem induzir mudanças nos padrões mínimos que caracterizam o fenótipo nuclear, i.e., área e perímetro nuclear e conteúdo de DNA, não foram encontrados na literatura. Entretanto, é conhecido que receptores de superfície celular, como o receptor para AGEs (RAGE), são capazes de se ligarem a proteínas glicosiladas da MEC, modificando a concentração intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}). Estes íons são requeridos no núcleo para iniciar inúmeros processos de transcrição gênica (Bishara et al., 2002). Sabe-se, também, que a morte celular é capaz de alterar a textura da cromatina, causando modificações na estabilidade do DNA, e de provocar a

diminuição da área nuclear e, conseqüentemente, do conteúdo de DNA (Maria et al., 2000).

Dessa forma, a escolha de camundongos da linhagem NOD para o presente estudo, visa não apenas o entendimento de possíveis modificações em anisotropias ópticas nos feixes de colágeno induzidas pelo diabetes, mas também o de alterações em alguns aspectos da morte celular e do fenótipo nuclear de fibroblastos, caso estas células sejam afetadas pela doença. A glicosilação *in vitro* do colágeno de uma linhagem de camundongos não-diabéticos é um controle indispensável e pode fornecer valiosas informações sobre a efetivação da glicosilação não-enzimática em camundongos NOD.

OBJETIVOS

1. Descrever e quantificar as propriedades anisotrópicas ópticas dos feixes de colágeno dos tendões do calcâneo e da cauda de camundongos da linhagem NOD, para investigar a cristalinidade e os estados texturais de agregação ordenada dos mesmos, após o estabelecimento do diabetes. Comparativamente estudar, também, tendões do calcâneo e da cauda de animais sadios (BALB/C) e após glicosilação *in vitro*;

2. Buscar alterações elicítadas pelo diabetes não unicamente relacionadas à proteína colagênica, mas também aos PGs da MEC, o que poderia ser informado por meio de extração enzimática e métodos histoquímicos/topoquímicos apropriados;

3. Verificar a ocorrência de resíduos de glicose não convertidos a produtos de Amadori disponíveis no colágeno glicosilado não-enzimaticamente;

4. Descrever o intumescimento e a extração em ácido acético a 3% dos feixes de colágeno de tendões da cauda de camundongos NOD em comparação a feixes de colágeno de tendões da cauda de animais sadios e após glicosilação *in vitro*;

5. Comparar o fenótipo nuclear dos fibroblastos de feixes de colágeno de camundongos sadios e NOD, buscando-se alterações elicítadas pelo diabetes;

6. Buscar aspectos indicativos de morte celular nos fibroblastos dos tendões estudados, estabelecendo-se parâmetros comparativos entre os animais NOD e camundongos da linhagem controle sadia.

CAPÍTULOS

Em face do exposto, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos:

Capítulo 1: Cristalinidade e estado de agregação ordenada em feixes de colágeno de tendões de camundongos diabéticos não-obesos (NOD).

Este capítulo contém dados que serão utilizados na elaboração de um artigo que será submetido à publicação na revista *Diabetic Medicine*.

Capítulo 2: Nuclear phenotype and cell death in tendon fibroblasts of non-obese diabetic (NOD) mice.

Artigo submetido à publicação na revista *Cellular Oncology*.

**CRISTALINIDADE E ESTADO DE AGREGAÇÃO ORDENADA EM FEIXES DE
COLÁGENO DE TENDÕES DE CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS NÃO-OBESOS (NOD)**

**Marcela Aldrovani Rodrigues¹, Ana Maria Aparecida Guaraldo², Maria Luiza
Silveira Mello¹ e Benedicto de Campos Vidal¹**

Departamento de Biologia Celular¹ e Centro Multidisciplinar para Investigações
Biológicas², UNICAMP, Campinas / SP, Brasil

Abreviações e Símbolos (*)

α	Incremento específico do índice de refração; também dados alfa (estatística)
λ	Comprimento de onda
μ	Micrômetros (10^{-6})
π	Pi
\bar{X}	Média
η	Mediana
AGEs	Produtos de glicosilação avançada (“Advanced glycosilation endproducts”)
ANOVA	Análise da variância (“Analysis of variance”)
AT	Azul de toluidina
BCL ₂	Família de proteínas que regula a ativação de procaspases
B.F.	Birrefringência de forma
B.I.	Birrefringência intrínseca
C	Concentração
Ca ²⁺	Íons cálcio
CEEA/IB	Comissão de ética em experimentação animal do Instituto de Biologia da UNICAMP
CEMIB	Centro multidisciplinar para investigações biológicas

CI	Intervalo de confiança (“Confidence interval”)
ConA	Concanavalina A
ConBr	Concanavalina Br
CS-4-6	Condroitin sulfatos 4 e 6
DAB	3-3’ Diaminobenzidina
D.C.	Dicroísmo circular
D.L.	Dicroísmo linear
DNA	Ácido desoxirribonucléico (“Deoxyribonucleic acid”)
F	Razão de duas variâncias
GAGs	Glicosaminoglicanos
GTPase RAC	Proteínas que modulam a produção de espécies de oxigênio reativo na mitocôndria
HCl	Ácido clorídrico
IU	Unidade internacional (“International unity”)
L	Litros
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
n	Índice de refração; também número de medidas, ou ainda, número de dados informativos
NaCl	Cloreto de sódio

nm	Nanômetros (10^{-9})
NOD	Diabéticos não-obesos (“Non-obese diabetic”)
P	Probabilidade
PGs	Proteoglicanos
pH	Logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio de uma solução
RAGE	Receptor para produtos de glicosilação avançada (“Receptor for advanced glycosilation endproducts”)
RNA	Ácido ribonucléico (“Ribonucleic acid”)
RO	Retardo óptico
ROS	Espécies de oxigênio reativo (“Reactive oxygen species”)
S	Volume parcial de um componente
SD	Desvio padrão (“Standard deviation”)
WLS	Estruturas como ondas (“Wave-like structure”)

(*) Sempre que uma abreviação teve que ser mantida na forma original, registrou-se entre aspas o termo em inglês correspondente.

Resumo

O *diabetes mellitus* provoca alterações na matriz extracelular (MEC) por meio da glicosilação não-enzimática das proteínas intercelulares, tal como o colágeno. No processo não-enzimático de glicosilação da proteína colagênica, o grupo aldeído da glicose reage com o grupamento amina livre de resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno, formando uma base Schiff reversível que origina os produtos de Amadori. Estes produtos dão origem aos produtos de glicosilação avançada (AGEs) que desencadeiam a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. As ligações cruzadas diminuem a flexibilidade e a permeabilidade dos tecidos e, provavelmente, são as causas principais do endurecimento de artérias em pacientes diabéticos. O presente estudo visa descrever e quantificar as propriedades anisotrópicas ópticas em feixes de colágeno glicosilados pelo diabetes; verificar a ocorrência de resíduos de glicose disponíveis no colágeno glicosilado; descrever o intumescimento e a extração de feixes de colágeno em ácido acético a 3% e, também, buscar alterações elicítadas pelo diabetes nos proteoglicanos (PGs) da MEC. Para isso, tendões do calcâneo e da cauda de camundongos NOD e BALB/C (não-diabéticos) foram submetidos aos seguintes experimentos: Medidas de retardo óptico (RO) das birrefringências; digestão enzimática com hialuronidase testicular; colorações com azul de toluidina (AT) pH 4.0 e concanavalina Br (ConBr) e intumescimento e extração do colágeno. Os resultados indicam que toda a glicose incorporada não-enzimaticamente é convertida a produtos de Amadori. O aumento no número de ligações cruzadas

intermoleculares torna as fibras de colágeno mais alinhadas, estáveis e com condições de empacotamento molecular mais intensas em relação às fibras de colágeno controle. A estabilidade torna o colágeno glicosilado mais resistente à extração por ácido acético a 3% e sugere a ocorrência de diminuição na taxa de remodelação tecidual de animais e/ou pacientes diabéticos. Em termos de ordem molecular (cristalinidade) dos feixes de colágeno, aparentemente o diabetes induz mudanças variáveis em função da estrutura, fato este que sugere a existência de significados fisio-patogênicos distintos. Quanto aos PGs da MEC, não foram observadas alterações elicitadas pelo diabetes nestas macromoléculas.

1. Introdução

O *diabetes mellitus* provoca alterações estruturais e químicas na matriz extracelular (MEC), comprometendo sua homeostasia (Zatecka et al., 2003).

A incorporação de glicose às proteínas da MEC é um dos fatores responsáveis pelas alterações clínicas observadas no *diabetes mellitus* (Bishara et al., 2002; Mentink et al., 2002). Essa via de incorporação da glicose independe de um mecanismo enzimático de caráter fisiológico e, geralmente, é referida como glicosilação não-enzimática de proteínas (Bailey et al., 1998) ou reação Maillard (Reddy et al., 2002).

A glicosilação não-enzimática, aparentemente, é mais significativa em proteínas que possuem longo período de atividade biológica, como por exemplo, o colágeno (Schnider e Kohn, 1982; Monnier, 1989; Paul e Bailey, 1996).

No processo não-enzimático de glicosilação da proteína colagênica, o grupo aldeído da glicose reage com o grupamento amina livre de resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno, formando uma base Schiff reversível que origina um produto de Amadori. Este produto origina compostos irreversíveis denominados produtos de glicosilação avançada (AGEs) que desencadeiam a formação de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno (Andreassen et al., 1988; Brownlee et al., 1988; Vlassara, 1994; Bailey et al., 1998; Singh et al., 2001; Mentink et al., 2002). As ligações cruzadas diminuem a flexibilidade e a permeabilidade dos tecidos (Bailey et al., 1998) e, provavelmente, são as causas principais do endurecimento de artérias em pacientes diabéticos (Mentink et al.,

2002). Não foram encontrados registros na literatura, considerando a hipótese de que alguns resíduos da glicose incorporada possam não ser convertidos a produtos de Amadori, permanecendo disponíveis no colágeno glicosilado não-enzimaticamente.

Há indícios de que a glicosilação não-enzimática ocorra preferencialmente na região de intervalo (“gap”) da fibra de colágeno. Esta área estaria mais acessível à glicose em relação às outras regiões da fibra (Wess et al., 1993). Entretanto, os padrões de banda D das fibras de colágeno dos tendões da cauda de ratos diabéticos não sofrem modificações organizacionais (Odetti et al., 2000).

As propriedades do colágeno após a glicosilação não-enzimática são afetadas em diferentes aspectos, tais como na habilidade para formar agregados supramoleculares (Bailey et al., 1998) e na susceptibilidade à degradação térmica (Hedge et al., 2002). Além disso, o colágeno glicosilado pode atuar como agente oxidante (Bailey et al., 1998). As propriedades de autofluorescência e a agregação cristalina do colágeno em pacientes diabéticos e em animais com diabetes experimental diferem daquelas do colágeno não-glicosilado (Andreassen et al., 1988), sendo que os fibroblastos têm a sua capacidade de produção de metaloproteinases e de contrair um gel de colágeno glicosilado reduzidas (Rittie et al., 1999).

Estudos realizados com colágeno tipo I, em tendões do calcâneo de coelhos, em diferentes intervalos de glicosilação *in vitro* (zero, duas, quatro, seis, oito e dez semanas) mostraram que no intervalo de seis a dez semanas é possível encontrar uma redução na extratibilidade do colágeno, admitindo-se, assim, que o

colágeno glicosilado seja mais resistente à colagenase, em relação ao colágeno sadio, em virtude da maior quantidade de ligações cruzadas intermoleculares (Reddy et al., 2002).

Experimentos nos quais feixes de colágeno de animais sadios foram tratados por hialuronidase testicular (enzima que digere ácido hialurônico e condroitin sulfatos 4 e 6) demonstraram que os glicosaminoglicanos (GAGs) da MEC contribuem significativamente para propriedades de anisotropia dos mesmos (Vidal, 1964 e 1986). Sabe-se, que em tendões do calcâneo de camundongos diabéticos obesos, há indícios de diminuição na orientação macromolecular de proteínas da MEC (Mello, comunicação pessoal, 2002).

Não há dúvidas, portanto, de que o diabetes altera as propriedades físico-químicas dos feixes de colágeno. No entanto, o assunto requer estudos mais aprofundados especialmente quanto ao entendimento sobre as relações diabetes – glicosilação não-enzimática – ordem molecular e/ou cristalinidade, o que pode ser obtido com o estudo da propriedade óptica anisotrópica de birrefringência do colágeno, por meio da microscopia de polarização. O uso de novos modelos experimentais, tais como camundongos diabéticos não-obesos (NOD) poderia informar sobre eventuais alterações de birrefringência, elicitadas pelo diabetes em feixes de colágeno.

A birrefringência é a anisotropia devida à diferença de índices de refração do objeto, o que significa propagação de luz com velocidades e direções diferentes. A birrefringência se expressa pela equação $B = n_e - n_o$, na qual n_e = índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário, e n_o = índice

de refração na direção do raio ordinário; este raio obedece às leis de refração ($n_o = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$) (Vidal, 1964).

Nas fibras de colágeno, dois tipos de birrefringência podem ser detectados (Vidal, 1964 e 1986): a birrefringência textural ou de forma e a birrefringência intrínseca.

(1) Birrefringência textural ou de forma (B.F.): resulta da compatibilidade dos comprimentos de onda (λ) com as dimensões da molécula e também com a alternância ordenada da grade molecular (Vidal, 1964 e 1986). As informações sobre a B.F. de um corpo são obtidas por meio de medidas acuradas de retardo óptico ($RO = n_e - n_o \times e$; onde e = espessura do material estudado) efetuadas em meios de embebição com índices crescentes de refração (Vidal, 1964 e 1986).

(2) Birrefringência intrínseca (B.I.): deve-se a transições de elétrons nas ligações peptídicas planares ao longo do eixo das fibras de colágeno (Cassim e Tobias, 1968; Vidal, 1964 e 1986; Vidal, 1987). No caso da birrefringência intrínseca, o índice de refração (n) pode ser descrito como uma função da polarizabilidade dos elétrons que transitam nas ligações peptídicas planares da molécula de colágeno, i.e., um campo de força externo, tal como a luz que é um campo eletromagnético, influencia no deslocamento da nuvem eletrônica situada nas ligações peptídicas. Este deslocamento responde pelo arranjo espacial dos elétrons na molécula de colágeno e, conseqüentemente, determina a velocidade e a direção na qual a luz se propagará (Vidal, 1987).

A B.F. somada à B.I. informa sobre a birrefringência total dos feixes de colágeno (Vidal, 1987).

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

1. Descrever e quantificar as propriedades anisotrópicas ópticas dos feixes de colágeno dos tendões do calcâneo e da cauda de camundongos da linhagem NOD, para investigar a cristalinidade e os estados texturais de agregação ordenada dos mesmos, após o estabelecimento do diabetes. Comparativamente estudar, também, tendões do calcâneo e da cauda de animais sadios (BALB/C) e após glicosilação *in vitro*;

2. Buscar alterações elicítadas pelo diabetes não unicamente relacionadas à proteína colagênica, mas também aos PGs da MEC, o que poderia ser informado por meio de extração enzimática e métodos histoquímicos/topoquímicos apropriados;

3. Verificar a ocorrência de resíduos de glicose não convertidos a produtos de Amadori disponíveis no colágeno glicosilado não-enzimaticamente;

4. Descrever o intumescimento e a extração em ácido acético a 3% dos feixes de colágeno de tendões da cauda de camundongos NOD em comparação a feixes de colágeno de tendões da cauda de animais sadios e após glicosilação *in vitro*.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados dez camundongos fêmeas¹ da linhagem NOD com 16 semanas de idade e durante a quarta semana de expressão do diabetes, e 10 camundongos da linhagem BALB/C de mesma idade como controle.

Os camundongos foram gentilmente cedidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, e mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp até a data do sacrifício. Os animais foram mantidos em gaiolas separadas e não houve restrição ao fornecimento de água e alimento durante o período experimental.

3.2. Sacrifício dos Animais e Preparação dos Tendões

Os camundongos foram sacrificados por decapitação, sendo este procedimento aprovado pela Comissão de ética em experimentação animal do Instituto de Biologia da Unicamp para o respectivo protocolo. Em seguida, as articulações tarsometatársicas e a cauda dos animais foram retiradas com o auxílio de bisturis e tesouras apropriadas.

As peças anatômicas destinadas à preparação de cortes histológicos foram fixadas *in totum* em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1 M a

¹A opção por fêmeas, deve-se ao fato, de que elas podem expressar o diabetes a qualquer momento a partir da 10ª semana de idade, enquanto os machos expressam a doença tardiamente (Guaraldo, *informação pessoal*, 2003).

pH 7.2 a vácuo por duas horas. Em seguida, foram transferidas para a geladeira onde permaneceram no fixador por mais 24 horas. A seguir, as peças foram lavadas em água destilada por 4 horas, sendo então, a pele removida e os tendões desinseridos do músculo e do osso. A fixação dos tendões prévia à desinserção evitou que a ação mecânica os deformasse. Os tendões foram processados para inclusão rotineira em parafina e seccionados com 7 μ m de espessura.

As peças anatômicas destinadas à glicosilação *in vitro* e ao teste de intumescimento não foram fixadas, sendo a pele removida e os tendões desinseridos do músculo e do osso. Os tendões foram encaminhados aos procedimentos referidos imediatamente após a desinserção.

3.3. Glicosilação *In Vitro*

Os tendões do calcâneo e da cauda de camundongos BALB/C, destinados à glicosilação *in vitro*, foram incubados por 36 horas em glicose 1.0 M em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4 a 29°C. Em seguida, foram reincubados em tampão fosfato (50 mM) por 14 dias. Foram adicionadas penicilina (300.000 IU/L) e nistatina (50.000 IU/L) ao tampão, a fim de prevenir o crescimento de bactérias e evitar a contaminação por fungos. O pH e a temperatura foram ajustados para as mesmas condições da incubação.

Transcorridos 14 dias, os tendões foram lavados em água destilada e divididos em dois grupos: um deles foi fixado e o outro encaminhado ao teste de intumescimento.

3.4. Medidas de Retardo Óptico (RO) das Birrefringências

Cortes histológicos com 7 μm de espessura foram “desparafinizados”, hidratados e, em seguida, embebidos por 30 minutos em água ($n = 1.33$); em soluções de glicerina com índices crescentes de refração – glicerina 20% ($n = 1.36$), glicerina 40% ($n = 1.39$), glicerina 60% ($n = 1.42$), glicerina 80% ($n = 1.44$), glicerina 100% ($n = 1.46$) – e em óleo mineral Nujol ($n = 1.48$), isto para determinação das birrefringências textural (ou de forma) e intrínseca dos feixes de colágeno (Vidal, 1964 e 1986; Roth e Freund, 1982; Whittaker et al., 1987).

As medidas de RO das birrefringências foram efetuadas, em cada meio de embebição, com os tendões posicionados a 45° dos azimutes de polarização dos polarizadores. Utilizou-se um microscópio de polarização Zeiss com objetiva de 40x equipado com luz monocromática ($\lambda = 546\text{nm}$) e compensadores especiais, seguindo os métodos de Sénarmont $\lambda/4$ e de Bräce–Köhler $\lambda/10$.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação dos retardos ópticos (RO) das amostras. Com as médias dos valores de RO em função dos índices de refração (n) dos meios de embebição construíram-se curvas de birrefringência de forma.

Medidas de RO das birrefringências dos feixes de colágeno dos tendões do calcâneo e da cauda de camundongos sadios e NOD também foram efetuadas em água e glicerina pura após digestão enzimática com hialuronidase testicular, com o fito de se detectar a participação dos produtos removidos pela hialuronidase na ordem molecular e na agregação dos feixes de colágeno.

3.5. Digestão Enzimática com Hialuronidase Testicular

Cortes histológicos com 7 μm de espessura e “desparafinizados” de tendões do calcâneo e da cauda de camundongos sadios e NOD foram mergulhados em celoidina por 10 segundos e, em seguida, tratados com hialuronidase testicular (1 mg de enzima/mL de NaCl a 0.9%, segundo Kiernan, 1990), por 6 horas em câmara úmida, em uma estufa a 37°C. Em seguida, a hialuronidase testicular foi retirada dos cortes e a celoidina removida com acetona. Os cortes foram lavados com etanol a 70% e, posteriormente, com água destilada.

3.6. Azul de Toluidina (AT) pH 4.0

Cortes histológicos com 7 μm de espessura de tendões de camundongos sadios e NOD foram corados em solução de AT a 0.025% em tampão McIlvaine 0.1 M pH 4.0 por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de molibdato de amônia a 4% por mais 15 minutos sendo, então, lavadas

em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá natural.

3.7. Método da Concanavalina Br – Peroxidase (ConBr – HRP)

Cortes com 7 μm de espessura de tendões da cauda glicosilados *in vitro* e de camundongos saudáveis foram tratados por 10 minutos em 100 mL de etanol absoluto acidificado com 0.2 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado para inibição da atividade de peroxidase endógena sendo, então, incubados por 10 minutos em solução de concanavalina Br (ConBr), lavados em água destilada e reincubados em solução de peroxidase de rábano silvestre. Os cortes foram lavados novamente, e incubados com 3–3' diaminobenzidina (DAB) por mais 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá natural.

3.8. Testes de Intumescimento e Extração do Colágeno

Policard e Collet (1961) descreveu com detalhes as alterações dimensionais de tendões de rato em solução de ácido acético a 3% e, posteriormente, Veis (1967) também se referiu aos efeitos dos ácidos orgânicos sobre o colágeno. Diferenças em intumescimento foram mostradas entre tendão e colágeno de ossos (Glimcher e Krane, 1967). Tendo por base estes relatos de que

é possível obter-se solubilização do colágeno em ácido acético, decidiu-se utilizar o método proposto por Koob e Vogel (1987) com algumas modificações. As modificações basearam-se na hipótese de que os íons sódio do tampão fosfato em cloreto de sódio (NaCl) 0.15 M utilizado pelos autores para equilibrar (lavar) os tecidos, pudessem introduzir falsas estabilizações às fibras de colágeno. Desta forma, foram realizados testes comparativos nos quais alguns fragmentos de tendão flexor bovino foram lavados em água, enquanto outros fragmentos foram lavados no tampão fosfato em NaCl 0.15 M. Estes testes confirmaram a hipótese inicial (ver resultados) e, por esta razão, os tendões a serem intumescidos foram lavados em água ao invés de serem lavados em tampão.

Tendões da cauda glicosilados *in vitro* e de camundongos saudáveis e NOD, foram lavados em água destilada gelada e, em seguida, colocados sobre papel de filtro para absorver o excesso de água. O peso das peças foi medido. Em seguida, os tendões foram mergulhados em água destilada na proporção de 500 vezes o seu volume, por uma hora, em geladeira (9°C). O excesso de água foi retirado em papel de filtro e o peso das peças novamente medido. A seguir os tendões foram colocados em uma solução de ácido acético a 3% por uma hora em geladeira. Terminado o tempo em solução ácida, os tendões, agora intumescidos, tiveram o excesso de solução removido e foram pesados novamente. Após a pesagem, os tendões foram recolocados em ácido acético a 3% onde permaneceram em geladeira até a dissolução do colágeno solúvel (aproximadamente 24 horas). Em seguida, a solução foi filtrada e o colágeno não-solúvel foi separado. Acrescentou-se ao filtrado NaCl a 10% no mesmo volume da solução ácida, com a finalidade de

se reconstituir as fibras de colágeno solúveis. O filtrado foi mantido em geladeira por 24 horas, e após este tempo, foi novamente submetido à filtração, removendo-se, assim, a solução de ácido acético e NaCl. As fibras de colágeno reconstituídas foram dialisadas. Após este processo, procedeu-se aos cálculos percentuais de aumento do peso e à análise estatística pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para os testes de intumescimento e extração foram utilizadas cinco caudas de cada amostra.

3.9. Documentação Fotográfica

As fotomicrografias foram obtidas com um microscópio Axioplan 2 Zeiss, equipado com objetivas Pol-Neofluares de diferentes aumentos, condensador 1.4, luz policromática e filme Kodak Gold ISO 100.

4. Resultados

4.1. Birrefringências dos Feixes de Colágeno

4.1.1. Morfologia dos Feixes de Colágeno

A morfologia dos feixes de fibras de colágeno dos tendões foi estudada em cortes histológicos, sem coloração, com base em suas birrefringências, tanto em amostras do controle (BALB/C) como em camundongos NOD. A Fig. 1 A-D mostra

o brilho máximo exibido pelos feixes de colágeno quando orientados a 45° dos azimutes de polarização dos polarizadores, sendo que as fibras que brilharam são aquelas cujo eixo coincide com o eixo do tendão.

Ao mudar-se a orientação dos feixes de colágeno, colocando-os paralelamente ou perpendicularmente aos azimutes de polarização, ocorreram modificações nas imagens birrefringentes, i.e, houve extinção na birrefringência das fibras que não mais estavam situadas a 45° dos polarizadores. Nestas condições observou-se a presença de imagens birrefringentes formando ondulações (“wave-like structure” – WLS ou “crimp”) ao longo do eixo longitudinal dos tendões (Fig. 1 E-H). As fibras que brilharam, neste caso, são aquelas cujo eixo não coincide com o eixo do tendão, i.e., as fibras que não brilharam quando o eixo do tendão estava posicionado a 45° dos azimutes de polarização dos polarizadores.

Tendões da cauda de camundongos exibiram “crimp” com distribuição mais uniforme ao longo do eixo longitudinal dos feixes de colágeno em relação aos tendões do calcâneo. Visualmente, não foram verificadas diferenças na distribuição das WLS entre tendões de camundongos sadios e diabéticos.

4.1.2. Valores dos Retardos Ópticos (RO) das Birrefringências

O diabetes e a glicosilação *in vitro* aumentaram os valores dos RO das birrefringências dos tendões em todos os meios de embebição, exceto em tendões

da cauda embebidos em glicerina pura onde se verificou a diminuição dos valores de RO.

Em água, os tendões da cauda das três amostras estudadas apresentaram maiores valores de RO quando comparados aos tendões do calcâneo de mesma condição experimental (Tabela 1).

Feixes de colágeno de tendões da cauda de animais sadios apresentaram menores valores de RO em água em relação aos feixes de tendões da cauda que foram glicosilados *in vitro* e de camundongos NOD (Tabela 1). Tendões do calcâneo de camundongos sadios apresentaram valores de RO menores que os de camundongos NOD em água (Tabela 1).

Medidas de RO efetuadas em tendões da cauda imersos em glicerina pura revelaram que os feixes de colágeno de animais sadios apresentam maiores valores de RO, quando comparados aos feixes de colágeno de tendões da cauda das demais amostras estudadas. No entanto, tendões do calcâneo de camundongos sadios imersos em glicerina pura exibiram menores valores de RO quando comparados às outras amostras de tendões do calcâneo (Tabela 2).

4.1.3. Valores de RO Após Digestão Enzimática com Hialuronidase Testicular

O tratamento dos cortes histológicos com hialuronidase testicular ocasionou a diminuição dos valores de RO das birrefringências dos feixes de colágeno de todas as amostras de tendões estudadas. Tendões de camundongos sadios continuaram apresentando menores valores de RO em água, em relação aos

tendões de NOD. Os valores de RO obtidos após a digestão enzimática estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

4.1.4. Curvas de Birrefringência de Forma

Com os valores de RO obtidos procedeu-se à construção de curvas de birrefringência de forma. Tais curvas permitiram a comparação entre as birrefringências totais (B.F. + B.I.), de forma e intrínseca dos feixes de colágeno estudados.

Em tendões do calcâneo (gráfico 1), as curvas mostram que feixes de colágeno de camundongos sadios possuem menores birrefringências de forma e intrínseca em relação às outras amostras analisadas. Dá-se ênfase ao achado de que a glicosilação elevou os valores de RO, i.e., a birrefringência em todos os meios de embebição.

Feixes de colágeno dos tendões do calcâneo de camundongos NOD possuem birrefringência intrínseca semelhante à dos feixes glicosilados *in vitro* (Anexo 1), o que foi confirmado pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 3). Tendões do calcâneo glicosilados *in vitro* exibem maiores birrefringências total e de forma em relação aos demais tendões do calcâneo estudados.

As curvas de birrefringência de forma dos tendões da cauda (Gráfico 2), mostraram que feixes de colágeno de camundongos sadios possuem menores birrefringências total e de forma e maior birrefringência intrínseca em comparação

com as demais amostras de tendões da cauda. Tendões da cauda glicosilados *in vitro* apresentam maiores birrefringências total e de forma e menor birrefringência intrínseca (Anexo 2) em relação aos tendões de camundongos saudáveis e NOD.

Como a B.F. aumenta com o diabetes e a glicosilação *in vitro*, as curvas de birrefringência de forma apresentam tendência a aproximar-se de uma parábola. Essa tendência mostrou-se maior em tendões da cauda do que em tendões do calcâneo.

4.2. Coloração com Azul de Toluidina (AT) pH 4.0

Os feixes de colágeno dos tendões de animais controle e NOD, corados com AT pH 4.0 e observados por microscopia de luz comum, não apresentaram metacromasia. Foi possível observar a presença de inúmeros núcleos de fibroblastos de aspecto fusiforme, distribuídos ao longo do eixo longitudinal do tendão (Fig. 2 A-B) e de mastócitos levemente arredondados e de intensa metacromasia, distribuídos isoladamente ou formando populações no peritendíneo e no tecido conjuntivo frouxo dos tendões (Fig. 3 A). Nas populações de mastócitos verificou-se a presença de células em processo de desgranulação (Fig. 3 B). Os mastócitos observados nos tendões foram utilizados como controle do fenômeno metacromático.

Os mesmos tendões observados por microscopia de polarização e com o seu maior eixo posicionado a 45° dos azimutes de polarização dos polarizadores exibiram um brilho de cor branca (Fig. 2 C-D).

4.3. Método da ConBr – HRP

Não foram verificadas diferenças de reação com a ConBr entre feixes de colágeno de tendões glicosilados *in vitro* e de camundongos saudáveis. Ambos os feixes foram examinados por microscopia de luz comum e exibiram reação fraca com a ConBr em suas porções centrais, i.e., corpo do tendão (Fig. 4 A-B). No peritendíneo e no tecido conjuntivo frouxo dos tendões a reação foi mais acentuada (Fig. 4 C).

4.4. Testes de Intumescimento e Extração dos Feixes de Colágeno

Testes comparativos nos quais alguns fragmentos de tendão flexor bovino foram lavados em água, enquanto outros fragmentos foram lavados em tampão fosfato em NaCl 0.15 M revelaram que tecidos lavados em tampão intumescem menos em ácido acético a 3% (Gráfico 3).

Tendões da cauda de camundongos não-diabéticos intumesceram mais em ácido acético a 3% em comparação com as demais amostras de tendões da cauda. Feixes de colágeno glicosilados *in vitro* intumesceram menos em relação aos outros feixes de colágeno estudados. Tendões de camundongos NOD intumescem menos que tendões de animais saudáveis e mais que tendões glicosilados *in vitro* (Gráfico 4). As medianas do intumescimento dos tendões, fornecidas pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis encontram-se descritas na Tabela 4. O teste de extração do colágeno revelou que feixes de

colágeno glicosilados *in vitro* são mais resistentes à extração por ácido acético a 3% (Tabela 5) sugerindo que estes feixes apresentam um número maior de ligações cruzadas intermoleculares em relação aos demais feixes estudados.

5. Discussão

5.1. Morfologia dos Feixes de Colágeno sem Coloração

Os feixes de colágeno glicosilados em animais diabéticos possuem maior diferença de caminho óptico em relação aos feixes de colágeno de animais sadios e, por isso, exibem brilho mais intenso quando um de seus eixos de propagação é colocado a 45° dos planos de polarização (Vidal, 1987).

As WLS/“crimp” observadas nos planos dos cortes histológicos são decorrentes de alterações na direção das fibras/feixes de colágeno ao longo do eixo longitudinal dos tendões. As porções dos feixes que apareceram em preto quando um dos eixos dos tendões foi posicionado perpendicularmente a um dos planos de polarização correspondem as regiões de extinção na qual as direções das fibras mudaram (Bennet, 1967). Tais mudanças na direção das fibras/feixes de colágeno representam uma organização estrutural que se caracteriza por uma variação periódica da orientação macromolecular (Vidal, 1995a). Tem sido descrito que o “crimp” reflete uma orientação em zig-zag das fibras de colágeno no plano do corte histológico (Gathercole e Keller, 1974; Baer et al., 1974). Entretanto, um arranjo helical das fibras de colágeno de tendões tem sido observado do

epitendíneo para o peritendíneo especialmente nas regiões onde duas fibras de colágeno se unem para formar um feixe de fibras (Vidal, 1995a).

É importante ressaltar que o colágeno apresenta características mesofasogênicas, i.e., de cristal-líquido. Essas características, juntamente com a ordem molecular (cristalinidade), estabelecem as condições necessárias para que os polímeros tenham propriedades piezo-piroelétricas (Athenstaed, 1974; Fukada, 1974) que geram sinalização celular. Já que feixes de colágeno podem gerar sinais para as células, é possível especular-se que tendões atuem como transdutores (Vidal, 2003). Assim, polímeros que possuem quiralidade e exibem aspecto bandado, i.e., WLS, e mais o efeito Cotton, têm um arranjo fibroso helical (Akagi et al., 1998).

Evidências diretas sobre a organização helical de polipeptídeos com propriedades piezoelétricas têm sido obtidas usando-se filmes de poli-L-benzil-glutamato (Jaworeck et al, 1998), sendo que as estruturas bandadas observadas nestes filmes são muito similares às WLS observadas nos feixes de colágeno (Vidal e Mello, 2001). Além disso, estudos de anisotropias ópticas de estruturas com bandas têm revelado que as moléculas apresentam um caminho helical semelhante a uma serpentina (Viney et al., 1983) e a auto-associação do colágeno tipo I em solução, produz um gel fibrilar com propriedades visco-elásticas que permitem a formação de linhas (fios) de colágeno com WLS e arranjo helical (Vidal, 1995b).

Atualmente, um modelo de nucleação e propagação que propõe o crescimento das fibrilas de colágeno a partir de um núcleo espiralado ou helical,

de modo similar ao crescimento espiralado freqüentemente observado em cristais constituídos de moléculas pequenas (Silver et al., 1992), tem sido admitido para as fibras de colágeno do tipo I e sustenta a proposta de que as fibrilas de colágeno apresentam arranjo helical (Vidal, 1995b e 2003).

A morfologia das WLS está relacionada ao comportamento biomecânico dos tendões, sendo que mudanças induzidas por fatores extrínsecos ou intrínsecos na distribuição dessas ondulações podem levar ao desenvolvimento de tendinopatias (Magnusson et al., 2001). As variações morfológicas observadas entre as WLS dos tendões do calcâneo e da cauda se devem às funções biomecânicas desempenhadas por eles. Tais variações são importantes para explicar as diferenças entre as curvas de birrefringência de forma dos tendões estudados.

Embora não tenham sido verificadas diferenças visuais de distribuição e morfologia entre as WLS de tendões de camundongos saudáveis e diabéticos, não podemos descartar a possibilidade de que o diabetes possa alterá-las. Provavelmente, o diabetes observado em camundongos NOD na quarta semana de expressão da doença não seria suficiente para induzir alteração morfológica das WLS. Entretanto, com o envelhecimento poderia ocorrer a diminuição do ângulo do “crimp” (Diamant et al., 1972; Wilmink et al., 1992). Estudos realizados em tendões de cavalos velhos revelaram que nestes animais os ângulos do “crimp” da porção central dos tendões é menor em relação aos da periferia (Wilmink et al., 1992; Patterson-Kane et al., 1997).

5.2. Birrefringências

O conhecimento das causas e da natureza das birrefringências de estruturas biológicas permite a determinação e a descrição da orientação molecular, do estado de agregação e da concentração dos componentes destas estruturas. Uma vez que a birrefringência deve-se a diferenças de índices de refração (n) dos objetos ($B = n_e - n_o$), é importante reportar que o n varia em função da concentração dos componentes da estrutura estudada. Tal concentração é expressa pela seguinte fórmula:

$$C = \frac{n_{ob} - n_m}{\alpha}$$

onde:

C = concentração;

n_{ob} = índice de refração de uma estrutura, v.g., colágeno

n_m = índice de refração do solvente ou meio de embebição

α = incremento específico do índice de refração, sendo que a $C\alpha$ corresponde ao aumento do n quando se dissolve $1g$ do material estudado em $1L$ do solvente (meio de embebição). Para proteínas, RNA e DNA o α equivale a $0.0018g$ (Hale, 1958). O α representa, também, o giro de uma substância que contém moléculas assimétricas em um plano de luz polarizada (poder rotatório),

sendo esta atividade óptica medida por um polarímetro (Vidal, informação pessoal, 2004). A microscopia de interferência baseada em microscopia de polarização permitiu a Vidal (1967 e 1970) determinar índices de refração, massas secas e birrefringências dos feixes de colágeno.

Medidas de RO das birrefringências correspondem ao melhor método para determinar a direção das vibrações eletrônicas e, conseqüentemente, da orientação cristalina e molecular em biopolímeros (Vidal, 1986; Vilarta e Vidal, 1989). Tais medidas são tão efetivas quanto os estudos de difração de raios-X na determinação da agregação cristalina de macromoléculas biológicas (Stein e Norris, 1956). No caso das fibras/feixes de colágeno e de outras proteínas fibrosas, as diferenças de RO das birrefringências intrínsecas são causadas pelas transições π - π^* das ligações peptídicas entre os aminoácidos. Os RO dessas ligações são proporcionais à densidade de superfície eletrônica (Cantor e Schimmel, 1980; Landowne, 1985).

A embebição dos cortes de tendões em água, em soluções de glicerina com índices crescentes de refração e em óleo mineral provê um meio adequado para a efetuação das medidas de RO e fornece informações fidedignas para a construção das curvas de birrefringência de forma, pois as fibras de colágeno emergem destas soluções com grau perfeito de ordem molecular (Vidal, 1964; Roth e Freund, 1982), mantendo intactas suas condições de empacotamento molecular (Leonardi et al., 1983).

Modificações na curva de birrefringência de forma de uma estrutura anisotrópica estão intimamente relacionadas a alterações na concentração, na ordem molecular e no estado de agregação ordenada de seus componentes macromoleculares (Schmidt, 1937; Frey-Wissling, 1948; Schmidt e Keil, 1958; Vidal, 1977 e 1986).

Pesquisas sobre a orientação macromolecular dos feixes de colágeno têm revelado a existência de variações no estado de agregação durante os processos de reparo (Vidal, 1966; Mello et al., 1975), envelhecimento (Mello et al., 1979), ossificação endocondral (Vidal, 1977) e nas diferentes regiões da cartilagem hialina (Vidal e Vilarta, 1988). O diabetes também provoca alterações na orientação macromolecular dos feixes de colágeno.

Considere-se, primeiro, o caso da glicosilação *in vitro* como um modelo que forneceu subsídios para a verificação da ocorrência e da eficiência da glicosilação não-enzimática *in vivo* provocada pelo diabetes em camundongos NOD. Com base na concentração e no período de exposição à glicose, na eficácia do processo realizado *in vitro*, nos resultados obtidos e no relato de que a incubação de tendões da cauda de ratos em glicose aumenta o número de ligações cruzadas de modo dose-dependente (Mentink et al., 2002), as alterações observadas nos feixes de colágeno glicosilados por este processo foram consideradas como equivalentes à alterações esperadas em pacientes e/ou animais cuja expressão do diabetes é maior que a expressão diabética apresentada por camundongos NOD. A expressão diabética máxima relatada para camundongos NOD é de aproximadamente 85% (Guaraldo, informação pessoal, 2004).

O aumento da birrefringência de forma, em termos de RO, dos feixes de colágeno glicosilados *in vitro* ou pelo diabetes em camundongos NOD deve-se ao aumento no número de ligações cruzadas intermoleculares. Com isso, as fibras de colágeno se tornam mais alinhadas, estáveis e com condições de empacotamento molecular mais intensas em relação ao controle.

A maior estabilidade apresentada pelos feixes de colágeno glicosilados não-enzimaticamente, quando comparados aos feixes controle, poderia alterar o índice apoptótico dos fibroblastos, já que o colágeno glicosilado interage com receptores para AGEs (RAGE) situados na membrana dessas células modificando a concentração dos íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular (Bishara et al, 2002). A fisiologia das mitocôndrias (“checkpoints” apoptóticos) e de algumas endonucleases dependem da homeostasia dos íons cálcio (Horton et al., 1998; Rizzuto, 2003). Além disso, o colágeno também interage com as integrinas da membrana celular, induzindo uma cascata de eventos intracelulares (mecanotransdução) (Chiquet, et al., 2003). Estudos recentes em colágeno tipo VI hipotetizam que dentre estes eventos poderiam estar a ativação das proteínas GTPase RAC (que modulam a produção de espécies de oxigênio reativo – ROS - na mitocôndria) e o controle dos níveis de expressão das proteínas da família BCL₂ que regula a ativação de procaspases (Rizzuto, 2003). Pode-se facilmente admitir que há possibilidade do colágeno tipo I também induzir tais eventos intracelulares (Vidal, informação pessoal, 2004).

Alterações de birrefringência intrínseca provocadas pelo diabetes evidenciam a ocorrência de modificações nos níveis de cristalinidade do colágeno.

Entretanto, estas alterações aparentemente são variáveis, fato este que sugere a existência de significados fisio-patogênicos diferentes em função da estrutura. Talvez o fluxo sanguíneo ou linfático e/ou a taxa de difusão requeridos por cada estrutura para o seu suprimento nutricional (eficiência fisiológica) e o passo da hélice do colágeno pudessem influenciar nas alterações de cristalinidade induzidas pelo diabetes. Esta idéia é consistente pelos fatos de que: (1) O colágeno de determinadas estruturas estaria mais exposto à glicose; (2) as fibras de colágeno não são paralelas e não se orientam em um único plano; (3) os produtos de glicosilação avançada (AGEs) que desencadeiam a formação de ligações cruzadas intermoleculares se dispõem perpendicularmente à molécula de colágeno. Dessa forma, em estruturas que possuem colágeno, cujo passo da hélice é curto, os elétrons que transitam entre as ligações peptídicas dos AGEs (ligações cruzadas) estariam predominantemente orientados paralelamente às ligações peptídicas da molécula de colágeno devido ao arranjo helical e à organização em vários planos das fibras de colágeno, ocasionando o aumento da birrefringência intrínseca. Já em feixes de colágeno, cujo passo da hélice é largo, os elétrons estariam em sua grande maioria transitando perpendicularmente às ligações peptídicas da molécula de colágeno. Neste caso, o fenômeno observado seria a diminuição da birrefringência intrínseca.

Relatos sobre modificações induzidas pelo diabetes no diâmetro das fibras de colágeno fortalecem a idéia da existência de variações nas alterações elicítadas pela doença. Fibras de colágeno de tendões da cauda e de nervos ciáticos endoneural e epineural de ratos com diabetes crônico, apresentam

maiores diâmetros ao serem comparadas às fibras de colágeno sadias (Wang et al., 2003), embora tendões do calcâneo de pacientes diabéticos tenham exibido fibras de colágeno com menores diâmetros, mais agregadas e diferindo morfológicamente, quando comparadas às de pacientes não-diabéticos (Mentink et al., 2002). Estudos sobre a opacidade corneal revelaram que o aumento nos níveis de glicosilação diminui o diâmetro das fibras de colágeno da córnea (Chakravarti et al., 1998).

As variações morfológicas observadas entre as WLS de tendões do calcâneo e da cauda explicam as diferenças de alteração, em termos de birrefringência intrínseca, que estes tendões apresentaram após a glicosilação não-enzimática.

Em tendões da cauda glicosilados *in vitro* e de camundongos diabéticos, os elétrons vibram perpendicularmente às ligações peptídicas da molécula de colágeno e, por essa razão, a birrefringência intrínseca diminuiu.

As diferenças de birrefringência intrínseca observadas entre tendões do calcâneo glicosilados e de camundongos sadios sugerem que com o estabelecimento do diabetes, os feixes de colágeno desta estrutura tornam-se mais cristalinos e com moléculas mais alinhadas em uma associação mais estável.

Estudos de difração de raios-X realizados em tendões do calcâneo, cujos feixes sofreram modificações nas ligações intermoleculares devido ao envelhecimento, apresentaram resultados semelhantes aos observados nos tendões do calcâneo de camundongos diabéticos não-obesos (Sinex, 1968).

Assim, o aumento da birrefringência intrínseca pode ser conseqüência de uma maior agregação das moléculas de colágeno devido às ligações cruzadas intermoleculares ou ao aumento nos níveis de cristalinidade do complexo (Mello et al., 1975).

Feixes de colágeno de tendões da cauda de camundongos sadios apresentam maior birrefringência intrínseca em relação aos tendões do calcâneo por possuírem fibras mais agregadas lateralmente e densidade de superfície eletrônica proporcional a esta agregação (Vidal, 1986).

Medidas de RO efetuadas após a digestão enzimática dos cortes histológicos com hialuronidase testicular revelaram a presença dos glicosaminoglicanos (GAGs) condroitin sulfatos 4 e 6 (CS-4-6) (Lison, 1960; Silberman e Fromer, 1973) na MEC de todas as amostras de tendões estudadas. A ligação de CS-4-6 aos feixes de colágeno aumenta os valores de RO e contribui para a birrefringência de forma destes feixes (Vidal, 1964 e 1986). A diminuição dos valores de RO após o tratamento com hialuronidase corrobora essa idéia. Além disso, baseado no estudo das propriedades anisotrópicas dos feixes de colágeno, tem sido proposto que GAGs, com vários níveis de helicidade, estariam orientados paralelamente às fibrilas de colágeno, enquanto o core protéico dos proteoglicanos (PGs) estaria inclinado em relação ao eixo das fibrilas de colágeno (Vidal, 1980). Este modelo ainda considera a possibilidade de uma interação dos PGs com o ácido hialurônico (Christner et al., 1978) e favorece as interações eletrostáticas das cargas positivas do colágeno com as cargas negativas dos GAGs (Vidal, 1963 e 1964). Aproximadamente 13% da birrefringência de forma

dos feixes de colágeno de tendões do calcâneo de ratos jovens é devida à presença dos GAGs (Vidal, 1964).

As propriedades mecânicas de uma fibra/feixe dependem da sua cristalinidade e do seu grau de orientação molecular (Zhao et al., 2003). Provavelmente, as alterações nos mecanismos de controle do estado de agregação, na orientação macromolecular e na cristalinidade dos componentes da MEC dos tecidos de pacientes e/ou animais diabéticos, comprometem estas propriedades.

5.3. Coloração com Azul de Toluidina (AT) pH 4.0

O AT é um corante tiazínico cujas propriedades ópticas têm sido exhaustivamente estudadas por inúmeros autores (Bergeron e Singer, 1958; Lison, 1960; Toepfer, 1970). A ligação eletrostática de substratos aniônicos ao AT é caracterizada pelas reações de basofilia e metacromasia e obedece aos princípios atuais da química supramolecular (Vidal, 1987 e informação pessoal, 2003).

A metacromasia, no caso do AT, é um efeito espectral caracterizado pelo abaixamento do pico original de absorção da luz, até muitas vezes o seu desaparecimento (hipocromismo), simultaneamente ao deslocamento dos maiores valores de absorbância para λ mais curtos (hipsocromismo). Uma das causas apontadas para a manifestação da metacromasia, é a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros por empilhamento das moléculas do corante (Lison, 1960),

sendo que o AT apresenta empilhamento ordenado espontâneo ou induzido por um biopolímero ácido (Vidal, 1963, 1977 e 1987). Os mastócitos possuem numerosos radicais aniônicos, tais como heparina, condroitin sulfato e GAGs sulfatados e, que portanto, coram-se metacromaticamente com AT, sendo ótimos modelos para o controle do fenômeno metacromático.

Na MEC, a solução de AT pH 4.0 liga-se aos grupos ânionicos dos GAGs (Lison, 1960; Mello e Vidal, 1972; Silberman e Fromer, 1973). Nos fibroblastos, o corante se liga aos grupamentos fosfatos livres dos ácidos nucleicos, i.e, DNA e RNA (Vidal, 1987).

Embora, medidas de RO da birrefringência avaliada em cortes histológicos tratados por hialuronidase testicular tenham evidenciado a presença dos GAGs CS-4-6 na MEC dos tendões estudados, a coloração com pH 4.0 não pôde evidenciá-las. Sabe-se que o pH da solução tampão tem muita importância nas colorações com AT, assim soluções com pH 2.5 coram grupos ácidos fortes como os sulfatos e soluções com pH 4.0 coram grupos carboxílicos. Grupos fosfatos se ligam melhor ao AT a pH 3.5 (Lison, 1960; Vidal, 1987; Vidal e Mello, 1989).

Fibras de colágeno de tendões de ratos adultos fixadas por formalina neutra, embebidas em parafina e tratadas com soluções de AT a pH 4.0 e 5.0 coram-se metacromaticamente exibindo dicroísmo linear negativo nos λ de 440 a 620-630nm e dicroísmo positivo nos λ de 630 a 680nm (Vidal e Mello, 1970; Mello e Vidal, 1973).

A comparação entre tendões de camundongos diabéticos não-obesos e sadios corados com AT a pH 4.0 indica que o diabetes, pelo menos em animais NOD, não causa decréscimo do conteúdo de GAGs e não afeta a capacidade de ligação do corante a estas macromoléculas, ao contrário do que ocorre no processo de envelhecimento (Mello et al., 1979). A capacidade de ligação do corante ao substrato é afetada por mudanças conformacionais nas macromoléculas (Mello et al., 1979). O envelhecimento provoca, além de mudanças no conteúdo de GAGs e talvez na reatividade do corante ao substrato, modificações no nível de orientação macromolecular destas estruturas polissacarídicas (Mello et al., 1979).

5.4. Método da ConBr – HRP

A concanavalina Br (ConBr) é uma lectina extraída de uma planta denominada *Canavalia brasilienses* (Leguminosae) que apresenta especificidade similar a Concanavalina A (ConA)(Sanz-Aparicio et al., 1997), ou seja, se liga a resíduos de manose e glicose que estão disponíveis no substrato (Pimentel e Vidal, 1990).

Diferentes tipos de colágeno possuem quantidades significativas de moléculas de glicose e glicose-galactose covalentemente ligadas aos seus resíduos de hidroxilisina (Pimentel e Vidal, 1990). Estes carboidratos laterais das moléculas de colágeno são importantes no processo de fibrilogênese (Hay, 1981)

e na interação do colágeno com a superfície celular dos fibroblastos (Goldberg, 1979; Goldberg e Burgeson, 1982).

A interação das lectinas com os substratos colagênicos depende da disponibilidade dos resíduos de açúcares da molécula de colágeno (Soderstrom, 1987). A comparação entre feixes de colágeno glicosilados *in vitro* e feixes controle sugeriu que: (1) Somente os açúcares adicionados ao colágeno dos tendões, durante sua biogênese, permaneceram disponíveis na molécula e (2) que toda a glicose incorporada pelo processo não-enzimático de glicosilação foi convertida à produtos de Amadori, i.e., não permaneceu disponível para ligação com a ConBr.

A baixa reatividade dos feixes de colágeno com a ConBr confirma a existência de outras macromoléculas da MEC interagindo com o colágeno. A interação dos PGs com os feixes bloqueia os resíduos de carboidratos do colágeno com respeito à sua reação com ConA (Pimentel e Vidal, 1990), uma vez que os GAGs dos PGs estão alinhados paralelamente ao eixo longitudinal das fibrilas (Vidal, 1980), e também a cadeia polipeptídica do core protéico dos PGs pode assumir uma conformação helical com respeito às fibrilas de colágeno (Vidal e Mello, 1984). Já a interação das glicoproteínas com o colágeno nem sempre resulta em bloqueio dos resíduos de glicose, como ocorre, por exemplo, com a fibronectina presente na membrana basal dos vasos sanguíneos. Claramente a fibronectina reage fortemente com as moléculas de colágeno (Yamada e Olden, 1978; Hynes, 1986), porém esta interação não evita a ligação da ConA aos resíduos de glicose dos colágenos tipo I e III (Pimentel e Vidal, 1990).

O fato de a reação ter sido mais intensa no peritendíneo deve-se à menor compactação das fibrilas de colágeno nesta região e, conseqüentemente, do maior número de resíduos de glicose livres (Pimentel e Vidal, 1990). A participação dos resíduos laterais de açúcar na polimerização (Brass e Bensusan, 1976) e na agregação das fibrilas de colágeno (Vidal, 1986), fortalece a idéia de que nos feixes de colágeno tipo I mais compactados, a maioria dos resíduos de glicose não estão disponíveis para ligação à ConA (Pimentel e Vidal, 1990).

5.5. Intumescimento e Extração do Colágeno

Os testes comparativos nos quais alguns fragmentos de tendão flexor bovino foram lavados em água, enquanto outros fragmentos foram lavados em tampão fosfato em NaCl 0.15 M, confirmaram as suspeitas de que os íons sódio do tampão utilizado por Koob e Vogel (1987), poderiam estabilizar os tendões através de ligações eletrostáticas com grupos aniônicos disponíveis no tecido. Assim, lavar fragmentos de tecido em água destilada seria o procedimento mais adequado para remover o excesso de sangue da estrutura a ser intumescida.

A suspeita em questão, surgiu do fato que a adição de NaCl a uma solução ácida contendo colágeno cria as condições necessárias (pH neutro) para a reconstituição das fibras colagênicas devido ao fato das moléculas desta glicoproteína conterem todas as informações necessárias para tal reconstituição (Piez, 1984; Trelstad e Silver, 1985). Estas informações são específicas de cada molécula e tornam possíveis os fenômenos espontâneos de auto-reconhecimento,

auto-associação e auto-organização molecular (Vidal, 1995b). Fibras de colágeno resultam de auto-reconhecimento e auto-associação, os quais produzem uma supraorganização altamente ordenada que define os tendões como superestruturas (Vidal, 1969; Whitesides e Grzybowski, 2002).

Os processos de auto-associação e auto-organização envolvem a informação temporal e podem apresentar controle cinético (Lehn, 2002), sendo que é bem conhecida a termodinâmica do processo de auto-associação (a cinética da energia de ativação da associação do colágeno tem sido determinada como sendo da ordem de 20-50kCal/mol para remoção das pontes de hidrogênio da água capazes de gerar sinais para as células) (Vidal, 1994).

Em termos evolutivos, a auto-organização é a força motriz que possibilita a evolução do mundo biológico a partir da matéria inanimada. Devido à labilidade das interações que conectam os componentes moleculares de uma entidade supramolecular, a auto-organização permite a seleção de um dado constituinte feito de um tipo bem definido de componente a partir de um conjunto de compostos com todas as constituições possíveis, sob a pressão de fatores internos e/ou externos (Lehn, 2002).

Da mesma forma que a auto-organização depende das propriedades físico-químicas da estrutura, os processos de intumescimento e extração também são dependentes destas características.

A diminuição da habilidade de intumescer observada em feixes de colágeno glicosilados pelo diabetes quando comparados ao controle, foi anteriormente relatada para tendões de animais velhos como sendo uma consequência de

mudanças nos estados físicos ou químicos das moléculas de colágeno (Kohn e Rollerson, 1959). Entretanto, o envelhecimento não altera as proporções de cadeias α e β do colágeno evidenciando que não ocorrem modificações nas ligações intramoleculares dessa glicoproteína (Bakermann, 1964). Assim, alterações nas ligações cruzadas intermoleculares seriam as principais responsáveis pela diminuição das propriedades de intumescimento e extração em ácido acético a 3% dos feixes de colágeno de animais velhos (Bakermann, 1964) ou afetados pelo diabetes.

Neste estudo não foi possível afirmar que modificações no conteúdo de GAGs da MEC dos tendões poderiam interferir nas propriedades de intumescimento e extração do colágeno de animais diabéticos, uma vez que tais modificações não foram evidenciadas pela coloração com AT pH 4.0. Entretanto, com base nos valores de RO das birrefringências, é possível afirmar que o colágeno de camundongos NOD possui mais ligações cruzadas intermoleculares que o colágeno de tendões da cauda de camundongos saudáveis.

A solubilidade do colágeno em ácido acético a 3% depende primariamente da extensão da quebra das ligações não-covalentes e covalentes que não estão estabilizadas por ligações cruzadas aldimina (Reddy et al., 2002). O colágeno glicosilado também é mais resistente à digestão por pepsina em comparação ao colágeno de animais saudáveis (Reddy et al., 2002). A solubilização do colágeno em pepsina deve-se essencialmente a clivagem de suas regiões não-helicais. Estas regiões são conhecidas por conterem ligações cruzadas inter e intramoleculares

(Schinider e Kohn, 1982). A maior fração de colágeno insolúvel observada nos feixes de colágeno glicosilados, ao compará-los aos feixes de colágeno de camundongos saudáveis, indica que há diferenças de susceptibilidade à degradação proteolítica entre eles (Reddy et al., 2002).

O colágeno solúvel dos tendões da cauda de todas as amostras estudadas provavelmente apresenta menos ligações cruzadas em comparação ao colágeno insolúvel. Tem sido proposto que o colágeno recém-sintetizado de animais diabéticos é menos estável, e dessa forma, sofreria depleção seletiva (Lien et al., 1984) e seria menos resistente à extração em ácido acético quando comparado ao colágeno preexistente. Pode ser que o colágeno recém-sintetizado represente a pequena fração solúvel extraída de tendões de animais diabéticos. Além disso, o colágeno glicosilado não-enzimaticamente por ser mais estável, provavelmente, possui menor taxa de remodelação que o colágeno de animais saudáveis, o que também justifica a grande quantidade de colágeno insolúvel por ele apresentada.

Em conclusão, os resultados demonstram que a glicose incorporada não-enzimaticamente ao colágeno foi totalmente convertida à produtos de Amadori, desencadeando a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. O aumento no número de ligações cruzadas intermoleculares alterou a ordem molecular (cristalinidade) e o estado de agregação ordenada dos feixes de colágeno, principal constituinte, dos tendões estudados. Alterações relacionadas ao colágeno são particularmente importantes, uma vez que essa proteína representa cerca de 30% do total das proteínas do organismo humano, e possui

inúmeras funções e ampla distribuição anatômica. Tais alterações comprometem o metabolismo da matriz extracelular e, possivelmente, a integridade biomecânica da estrutura.

6. Bibliografia (de acordo com a revista *Diabetic Medicine*)

AKAGI K, PIAO G, KANEKO S, SAKAMAKI K, SHIRAKAVA H, KYOTAMI M, 1998. Helical polyacetylene synthesized with a chiral nematic reaction field. *Science*, 282:1683-1686.

ANDREASSEN TT, OXLUND H, DANIELSEN CC, 1988. The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Connective Tissue Research*, 17:1-9.

ATHENSTAED H, 1974. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. *Ann. NY acad. Sci.*, 238:68-94.

BAER ET, GATHERCOLE LJ, KELLER A, 1974. Structure hierarchies in tendon collagen: an interim summary. In: Atkins, E.T., Keller, A. (Eds.), *Structure of Fibrous Biopolymers*, Proceeding of the Colston Research Society, University of Bristol, 189-195.

BAILEY AJ, PAUL RG, KNOTT L, 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. In: *Mechanisms of Ageing and Development*. 106:1-2:1-56.

BAKERMANN S, 1964. Distribution of the α - and β - components in human-skin collagen with age. *Biochim. Biophys. Acta*, 90:621-623.

- BENNET HS, 1967. The microscopical investigation of biological materials with polarized light. In: Jones, R.M., (Ed.), McClung's Handbook of Microscopical Technique, Hafner Publishing Co, New York, 591-677.
- BERGERON JÁ e SINGER M, 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:433-457.
- BISHARA NB, DUNLOP ME, MURPHY TV, DARBY IA, RAJANAYAGAM MAS, HILL, MA, 2002. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca^{++} signaling in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 198:80–92.
- BRASS LF e BENSUSAN HB, 1976. On the role of the hydrate residues in the platelet-collagen interaction. *Biochem. Biophys. Acta*, 444:43-52.
- BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H, 1988. Advanced glycosilation endproducts in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Eng. Med.*, 318:1315-1321.
- CANTOR CR e SCHIMMEL PR, 1980. *Biophysical Chemistry II: techniques for the study of biological structure and function*, ed. By Freemann, W.H., San Francisco.
- CASSIM JY e TOBIAS OS, 1968. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. *Biochim. Biophys. Acta*, 168:463–471.
- CHAKRAVARTI S, MAGNUSON T, LASS JH, JEPSEN KJ, LAMANTIA C, CARROLL H, 1998. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell. Biol.* 141(5):1277-1285.

- CHIQUET M, RENEDO AS, HUBER F, FLÜCK M, 2003. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biology*, 22:73-80.
- CHRISTNER J, BROWN ML, DZIEWIATBOSKI DD, 1978. Affinity binding of the cartilage proteoglycan protein-keratan sulfate core to the immobilized hyaluronic acid. *Analyt. Biochem.*, 90:22-32.
- DIAMANT J, KELLER A, BAER E, LITT M, ARRIDGE RGC, 1972. Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as function of ageing. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 180: 293-315.
- FREY-WISLING A, 1948. *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives*. Elsevier, Amsterdam, 194-206.
- FUKADA E, 1974. Piezoelectric properties of organic polymers. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 238:7-25.
- GATHERCOLE LJ e KELLER A, 1974. Light microscopic waveforms in collagenous tissues and their structural implications. In: *Structure of Fibrous Biopolymers*. Atkins EDT, Keller A. ed. Proceedings of the Colston Research Society-University of Bristol. pp.153-187.
- GLIMCHER MJ e KRANE SM, 1968. The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification. *Treatise on Collagen*, Gould, B.S.(edit.) 2:76-77.
- GOLDBERG B, 1979. Binding of soluble type I collagen molecules to the fibroblasts plasm membrane. *Cell*, 16:265-275.
- GOLDBERG BD e BURGESSON RE, 1982. Binding of soluble types I collagen to fibroblasts: specificities for native collagen types, triple helical structure,

- telopeptides properties and cyanogen bromide-derived peptides. J. Biol. Chem., 95:752-756
- HAY ED, 1981. Extracellular matrix. J. Cell. Biol., 91(3):205-223.
- HALE AJ, 1958. The interference microscope in biological reserch. E&S. Livingstone LTD, Edinburgh and London, pp.74-76.
- HEDGE PS, CHANDRAKASAN G, CHANDRA TS, 2002. Inhibition of collagen glycation and crosslinking *in vitro* by methanolic extracts Finger millet (*Eleusine coracana*) and Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*). The Journal of Nutritional Biochemistry, 13(9):517-521.
- HORTON JR WE, FENG L, ADAMNS C, 1998. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. Matrix Biology, 17:107-115.
- HYNES RO, 1986. Fibronectins. Sci. Am., 253(6);32-41.
- JAWORECK T, NEHER D, WIRINGA RH, SCHOUTEN AJ, 1998. Eletromechanical properties of an ultrathin layer of directionally aligned helical polypeptides. Science, 279:57-60.
- KIERNAN JA, 1990. Histological and histochemical methods: theory and practice. Pergamom Press. Oxford, pp.8; pp.150.
- KOHN RR e ROLLERSON E, 1959. Studies on the effect of heat and age in decreasing ability of human collagen to swell in acid. J. Geront., 14:11-15.
- KOOB TJ e VOGEL KG, 1987. Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. J. Orthop. Res., 5:414-424.

- LANDOWNE D, 1985. Molecular motion underlying activation and inactivation of sodium channels in squid giant axons. *J. Membrane Biol.*, 88:171-185.
- LEHN JM, 2002. Toward self-organization and complex matter. *Science*, 295:2400-2402.
- LEONARDI L, RUGGIERE A, ROVERI N, BIGI A, REALE E, 1983. Light microscopy, electron microscopy, and X-ray diffraction analysis of glycerinated collagen fibers. *J. Ultrastruct. Res.*, 85:228-237.
- LIEN YH, STERN R, FU JCC, SIEGEL RC, 1984. Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent cross-linking by glucose. *Science*, 225:1489-1491.
- LISON L, 1960. *Histochimie et Cytochimie Animales: Principes et Methodes*. Gauthier-Villar. Paris. pp.293-294; pp.415-417; pp523.
- MAGNUSSON SP, AAGAARD P, ROSAGER S, DYHRE-POUELSEN P, KJAER M, 2001. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis in vivo. *J. Physiol.*, 531:277-288.
- MELLO MLS e VIDAL BC, 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochem*, 18:103-122.
- MELLO MLS, GODO C, VIDAL BC, ABUJADI JM, 1975. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Ann. Histochem*, 20:145-152.
- MELLO MLS, VIDAL BC, CARVALHO AC, CASEIRO-FILHO AC, 1979. Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. *Gerontology*, 25:2-8.

- MENTINK CJAL, HENDRIKS M, LEVELS AAG, WOLFFENBUTTEL BHR, 2002. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clinica Chimica Acta*, 321:69-76.
- MONNIER VM, 1989. Mailard theory of ageing. In: BAYNES, J,W., MONNIER, V.M. (Eds.), *The Mailard reaction in aging, diabetes, and nutrition*. Alan R. Liss, New York, pp.1-22.
- ODETTI P, ARAGNO I, ROLANDI R, GARIBALDI S, VALENTINI S, COSSO L, TRAVERSO N, COTTALASSO D, PRONZATO MA, MARINARI UM, 2000. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils: role of protein glycation. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 16 (2):74-81.
- PATERSON-KANE JC, FIRTH EC, GOODSHIP AE, PARRY DA, 1997. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Aust.Vet. J.*, 75: 39-44.
- PAUL RG e BAILEY AJ, 1996. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28:1297-1310.
- PIEZ KA, 1984. Molecular and aggregate structures of the collagens. In: Piez, K.A., Reddi, A.H., eds. *Extracellular matrix biochemistry*. New York: Elsevier Sci. Publishing Co., Ins., 24-26.
- PIMENTEL ER e VIDAL BC, 1990. Interaction of concanavalin A with sugar residues of collagen from different tissues. *Rev. Brasil. Biol.*, 50(3):689-693.

- POLICARD A e COLLET A, 1961. Physiologie du tissue conjonctive. Normal et Pathologique. Masson et C^{ie}. Paris. pp.94.
- REDDY GK, STEHNO-BITTEL L, ENWEMEKA S, 2002. Glycation-induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon. Archives of Biochemistry and Biophysics, 399:174-180.
- RITTIE L, BERTON A, MONBOISSE JC, HORNEBECK W, GILLERY P, 1999. Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 264:(2)488-492.
- RIZZUTO R, 2003. The collagen-mitochondria connection. Nature Genetics, 35:300-301.
- ROTH S e FREUND I, 1982. Second harmonic generation and orientational order in connective tissue: a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. J. Appl. Cryst., 15:72–78.
- SANZ-APARICIO J, HERMOSO J, GRANGEIRO TB, CALVETE JJ, CAVADA BS, 1997. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. FERS Letters. 114-118.
- SCHMIDT WJ, 1937. Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. G. Borntrager.
- SCHMIDT WJ e KEIL A, 1958. Die gesunden und die erkrankten Zahngewebe des Menschen und der Wirbeltiere unter dem Polarisationsmikroskop. Carl Hansen.

- SCHNIDER AM, KOHN RR, 1982. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Exp. Geront.* 17:185-194.
- SILBERMANN M e FROMER J, 1973. Dynamic changes in acid mucopolysaccharides during mineralization of the mandibular condylar cartilage. *Histochemie*, 36:185-192.
- SILVER D, MILLER J, HARRISON R, PROCKOP DJ, 1992. Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9860-9864.
- SINEX FM, 1968. The role of collagen in aging. In: *Treatise on collagen*. Acad. Press, New York, 2B:409-448.
- SINGH R, BARDEN A, MORI T, BEILIN L, 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44:129-146.
- SODERSTROM KO, 1987. Lectin binding to collagen strands in histologic tissue sections. *Histochemistry*, 87:557-560.
- STEIN RS e NORRIS H, 1956. The X-ray diffraction, birefringence and infrared dichroism of stretched polyethylene. *J. Polymer. Sci.*, 21:381-396.
- TOEPFER K, 1970. *Die Thiazinfarbstoffe*. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.
- TRESTALD RL e SILVER FH, 1985. Matrix assembly. In: Hay, E.D., ed. *Cell biology of extracellular matrix*. New York and London: Plenum Press, 179-215.
- VEIS A, 1967. Intact collagen. In: *Treatise on Collagen* Ramachandran, G.N. (Eds.), 1:380-381.

- VIDAL BC, 1963. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56:529-536.
- VIDAL BC, 1964. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma*, 59:472-479.
- VIDAL BC, 1966. Macromolecular disorientation in detached tendons. *Protoplasma*, 62:121-132.
- VIDAL BC, 1967. Desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina – estudo experimental. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas, para concorrer ao Cargo de Professor Titular da Cadeira de Patologia.
- VIDAL BC, 1969. Collagen bundle regulation and control (Biocybernetics). *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 2:356-359.
- VIDAL BC, 1970. Interferometric and histochemical investigation on collagen bundles: refractive indices and dry masses prior and after staining with orange G. *Ann. Histochem.*, 15:191-205.
- VIDAL BC, 1977. Acid glycosaminoclycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.*, 22:45-64.
- VIDAL BC, 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Moll. Biol.*, 26:415-421.
- VIDAL BC, 1984. Orden molecular y haces de colageno. In: *Trabajos del Instituto Cajal*. LXXV. pp.19-27.

- VIDAL BC, 1986. Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. Mol. Biol.*, 32: 527–535.
- VIDAL BC, Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro. Atheneu, 1987. 348p. pp.05-34.
- VIDAL BC, 1994. Cell and extracellular matrix interaction: a feed back theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev. Fac. Ciênc. Médicas/UNICAMP*, 4:1-11.
- VIDAL BC, 1995a. Crimp as part of a helical structure. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 318:173–178.
- VIDAL BC, 1995b. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 318:831–836.
- VIDAL BC, 2003. Image analysis of linear dichroism in collagen-nano-silver complexes. *Microscopy and Analysis (UK)*, pp.21-23.
- VIDAL BC e MELLO MLS, 1970. Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. *Histochemie*, 23:176-179.
- VIDAL BC e MELLO MLS, 1984. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.*, 30(3):195-204
- VIDAL BC e VILARTA R, 1988. Articular cartilage: collagen II-proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variations in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem.*, 83:189-205.

- VIDAL BC e MELLO MLS, 2001. Chirality and helicity of poly-L-benzyl glutamate in liquid crystal and WLS that mimics collagen helicity in crimp. *Mater. Res.*, 4:1969-173.
- VILARTA R e VIDAL BC, 1990. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregational and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, 9:55-61.
- VINEY C, DONALD AM, WINDLE AH, 1983. Optical microscopy of banded structures in oriented thermotropic polymers. *J. Mater. Sci.*, 18: 1136-1142.
- VLISSARA H, 1994. Recent progress on the biological and clinical significance of advanced glycosylation endproducts. *J. Lab. Clin. Med.*, 124:19-30.
- WANG H, LAYTON BE, SASTRY AM, 2003. Nerve collagens diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an atomic force microscopy study. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 19(4):288-298.
- WESS TJ, WESS L, MILLER A, LINDSAY RM, BAIRD JD, 1993. The in vivo glycation of diabetic tendon collagen studied by neutron diffraction. *J. Mol. Biol.*, 230:1297-1303.
- WHITESIDES Ge GRZYBOWSKY B, 2002. Self-assembly at all scale. *Science*, 295:24180-24210.
- WILMINK J, WILSON AM, GOODSHIP AE, 1992. Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibers in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res. Vet. Sci.*, 53:354-359.

- WHITTAKER P, BOUHNER DR, PERKINS DG, CNHAM PB, 1987. Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendinae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br. Heart*, 57:264-269.
- YAMADA KM e OLDEN K, 1978. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275:179-184.
- ZATECKA Jr, D.S., KADOR, P.F., GARCIA-CASTINÉIRAS, S., LOU, M.F., 2003. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *American Diabetes Association, Inc* 52(4):1022-1042.
- ZHAO C, YAO J, MASUDA H, KISHORE R, ASAKURA T, 2003. Structural characterization and artificial fiber formation of *Bombyx mori* silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Wiley Periodicals. Inc.*, 253-259.

TABELA 1:

Retardos ópticos, em nm, de cortes histológicos de tendões embebidos em água.

Tratamento estatístico: ANOVA.

Amostra	n	\bar{X}	SD	Amostra	n	\bar{X}	SD
CC	60	43.4	2.7	C-HIAL	50	28.0	3.6
TC	78	44.8	5.9	T-HIAL	50	26.7	4.2
C-NOD	60	48.5	6.2	C-NOD-HIAL	50	29.4	4.8
T-NOD	78	50.7	7.5	T-NOD-HIAL	50	30.2	3.9
C-GLIC	60	53.7	7.3				
T-GLIC	78	54.8	10.1				

CC = tendão do calcâneo controle; C-GLIC = tendão do calcâneo glicosilado *in vitro*; C-HIAL = tendão do calcâneo controle tratado por hialuronidase; C-NOD = tendão do calcâneo de NOD; C-NOD-HIAL = tendão do calcâneo de NOD tratado por hialuronidase; TC = tendão da cauda controle; T-GLIC = tendão da cauda glicosilado *in vitro*; T-HIAL = tendão da cauda controle tratado por hialuronidase; T-NOD = tendão da cauda de NOD; T-NOD-HIAL = tendão da cauda de NOD tratado por hialuronidase. n = número de medidas; SD = desvio padrão; \bar{X} = média dos RO.

TABELA 2:

Retardos ópticos, em nm, de cortes histológicos de tendões embebidos em glicerina pura. Tratamento estatístico: ANOVA.

Amostra	n	\bar{X}	SD	Amostra	n	\bar{X}	SD
CC	60	8.5	1.9	C-HIAL	50	8.3	1.0
TC	78	11.6	1.8	T-HIAL	50	10.3	1.9
C-NOD	60	11.8	1.2	C-NOD-HIAL	50	10.2	1.6
T-NOD	78	10.4	1.6	T-NOD-HIAL	50	8.4	1.6
C-GLIC	60	11.8	1.7				
T-GLIC	78	9.3	1.5				

CC = tendão do calcâneo controle; C-GLIC = tendão do calcâneo glicosilado *in vitro*; C-HIAL = tendão do calcâneo controle tratado por hialuronidase; C-NOD = tendão do calcâneo de NOD; C-NOD-HIAL = tendão do calcâneo de NOD tratado por hialuronidase; TC = tendão da cauda controle; T-GLIC = tendão da cauda glicosilado *in vitro*; T-HIAL = tendão da cauda controle tratado por hialuronidase; T-NOD = tendão da cauda de NOD; T-NOD-HIAL = tendão da cauda de NOD tratado por hialuronidase. n = número de medidas; SD = desvio padrão; \bar{X} = média dos RO.

TABELA 3:

Análise dos valores de RO, em nm, de cortes histológicos de tendões do calcâneo embebidos em glicerina pura. Tratamento estatístico: teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Amostra	η	$\eta^1 - \eta^2$	95% - CI
<i>C-NOD</i>	11.647		
		-0.165	0.330-0.661
<i>C-Glic</i>	12.060		

$$W = 3465.5; \alpha = 0.05$$

C-Glic = tendão do calcâneo glicosilado *in vitro*; C-NOD = tendão do calcâneo de NOD; η = mediana populacional. Número de medidas = 60.

TABELA 4:

Intumescimento dos tendões da cauda de camundongos após uma hora de imersão em ácido acético a 3%.

Amostra	η	Z
<i>Não-diabético</i>	2702.0	2.45
<i>NOD</i>	1173.3	0.06
<i>glicosilado</i>	366.5	-2.51

$$P = 0.008$$

η = mediana de intumescimento dos tendões. Número de caudas = 5.

TABELA 5:

Mediana de pesos em miligramas (mg) dos colágenos solúveis de amostras de tendões da cauda de camundongos obtidos após a extração em ácido acético a 3%

Amostra	CS + CI		CS	
	η	Z	η	Z
<i>Não-diabético</i>	1.15	1.41	1.08	2.82
<i>NOD</i>	0.66	0.06	0.25	-0.37
<i>glicosilado</i>	0.63	-1.47	0.17	-2.45

$$P (CS + CI) = 0.250; P (CS) = 0.09$$

CS = colágeno solúvel; CS + CI = peso inicial correspondente ao colágeno solúvel mais colágeno insolúvel; η = mediana. Número de caudas = 5.

GRÁFICO 1:

Curvas de birrefringência de forma de tendões do calcâneo de camundongos

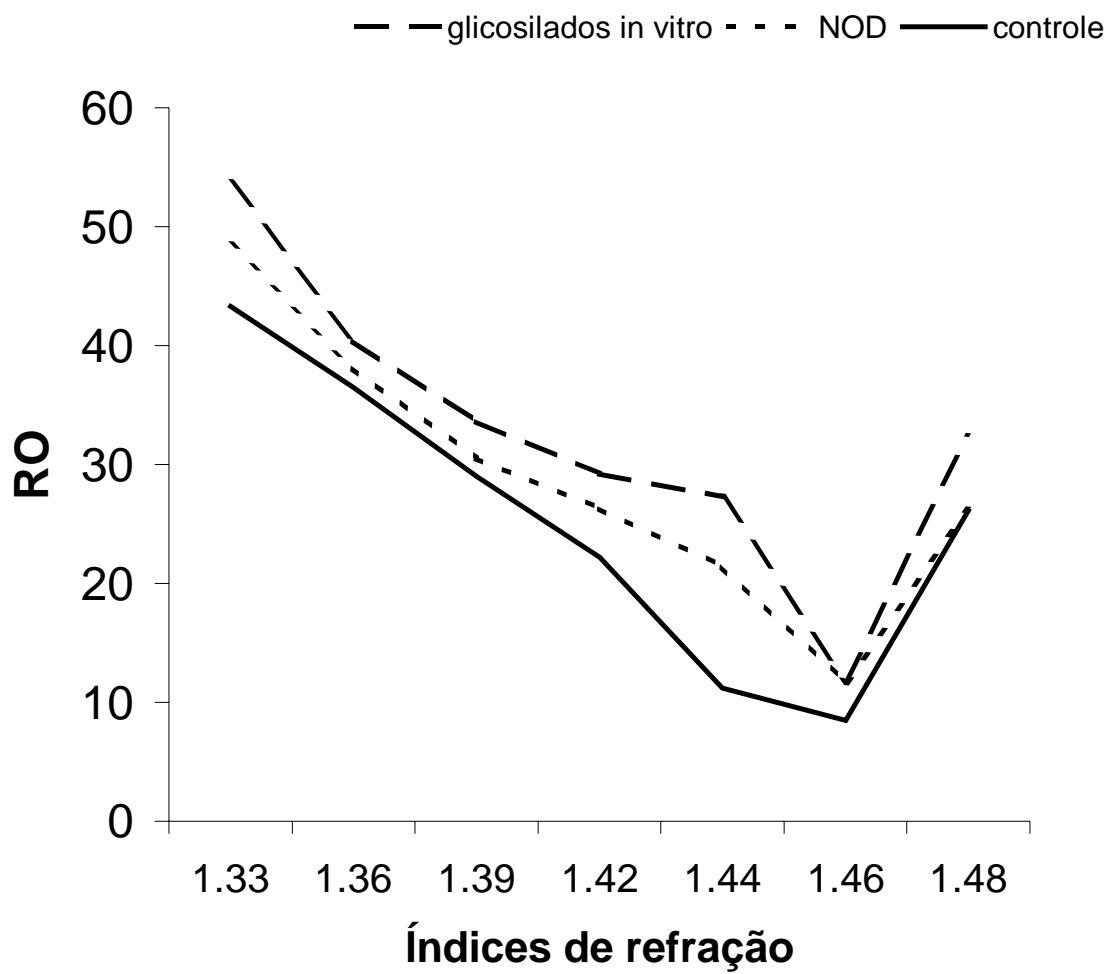


GRÁFICO 2:

Curvas de birrefringência de forma de tendões da cauda de camundongos

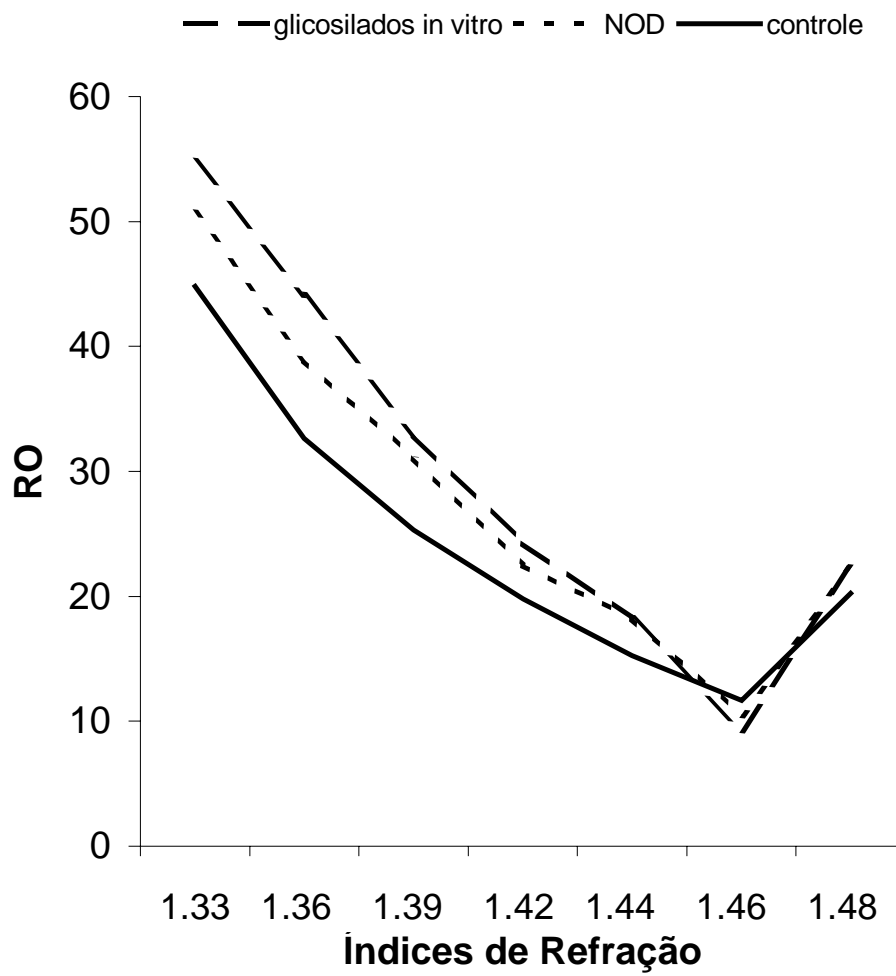


GRÁFICO 3:

Intumescimento de tendões flexores bovinos após uma hora de imersão em ácido acético a 3%

Varição do peso úmido (%)

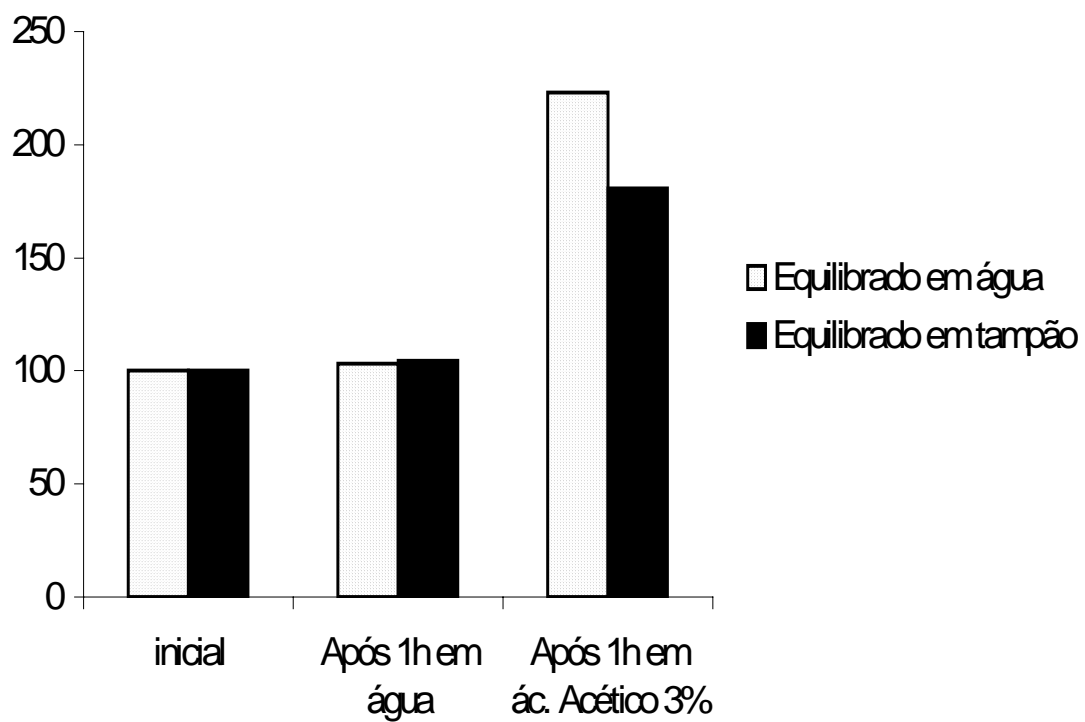
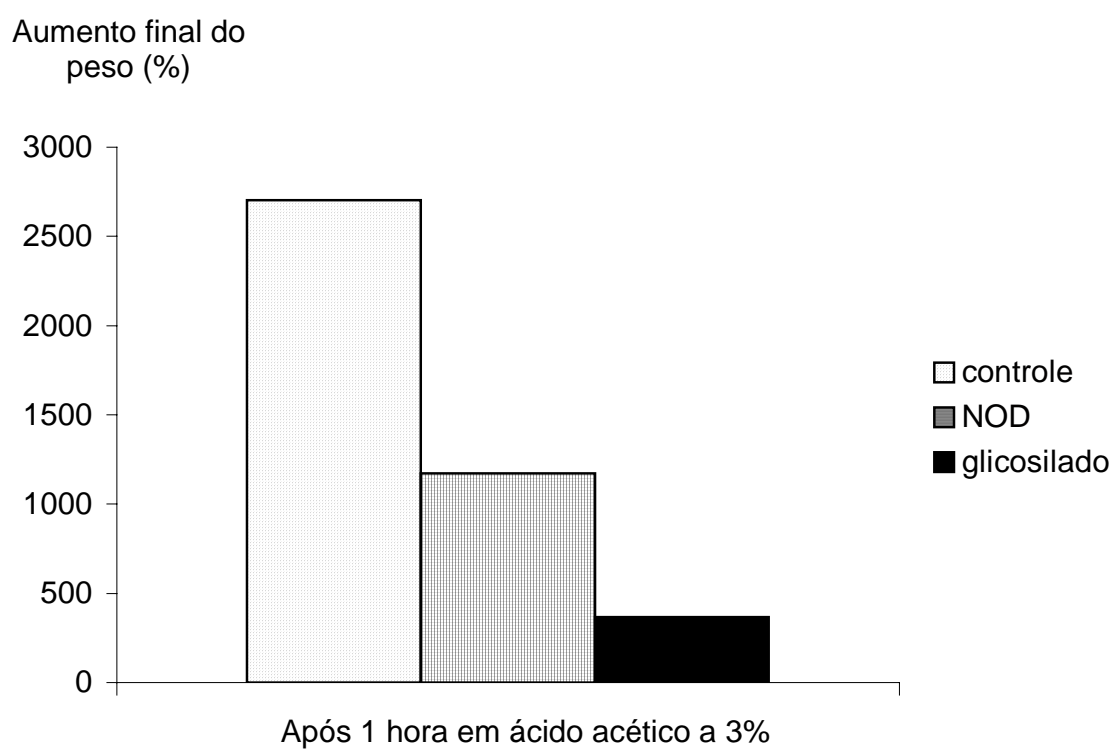


GRÁFICO 4:

Intumescimento de tendões da cauda glicosilados *in vitro* e de camundongos saudios e NOD após uma hora de imersão em ácido acético a 3%



LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 A-D: Micrografia dos feixes de colágeno de tendões do calcâneo e da cauda, sem coloração e a 45° dos polarizadores, mostrando suas birrefringências. A = tendão do calcâneo de camundongo NOD; B = tendão do calcâneo de camundongo BALB; C = tendão da cauda de camundongo NOD; D = tendão da cauda de camundongo BALB. Barra: $200\ \mu\text{m} = 9\ \text{mm}$.

Figura 1 E-H: Feixes de colágeno de tendões do calcâneo e da cauda, sem coloração e posicionados perpendicularmente aos polarizadores. Observar a presença de ondulações (“crimp”) ao longo do eixo longitudinal dos feixes. E = tendão do calcâneo de camundongo NOD; F = tendão do calcâneo de camundongo BALB; G = tendão da cauda de camundongo NOD; H = tendão da cauda de camundongo BALB. Barra: $200\ \mu\text{m} = 9\ \text{mm}$.

Figura 2 A-B: Feixes de colágeno extraídos de tendões da cauda de camundongos BALB (A) e NOD (B), corados com AT pH 4.0. Notar que os feixes não coraram com o AT, entretanto, os fibroblastos tornaram-se evidentes com a coloração. Barra: $200\ \mu\text{m} = 9\ \text{mm}$.

Figura 2 C-D: Feixes de colágeno extraídos de tendões da cauda de camundongos BALB (C) e NOD (D), corados com AT e observados por

microscopia de polarização. O eixo maior dos tendões foi posicionado a 45° dos azimutes de polarização. Nestas condições observou-se um brilho de cor branca. Barra: 200 μm = 9 mm.

Figura 3: Micrografia de tendões da cauda de camundongos NOD (A) e BALB (B). Observar a presença de mastócitos granulosos (\longrightarrow) e em processo de desgranulação ($\text{---}\bullet$) no tecido conjuntivo frouxo dos tendões. Barra: 100 μm = 10 mm.

Figura 4: Micrografia de feixes de colágeno sadios (A e C) e glicosilados *in vitro* (B) corados com ConBr. Observar em A e B que o corpo do tendão das duas amostras estudadas apresentou fraca reação à ConBr. Entretanto, no peritendíneo (C) a reação foi mais acentuada. Barra: 150 μm = 9 mm.

FIGURA 1:

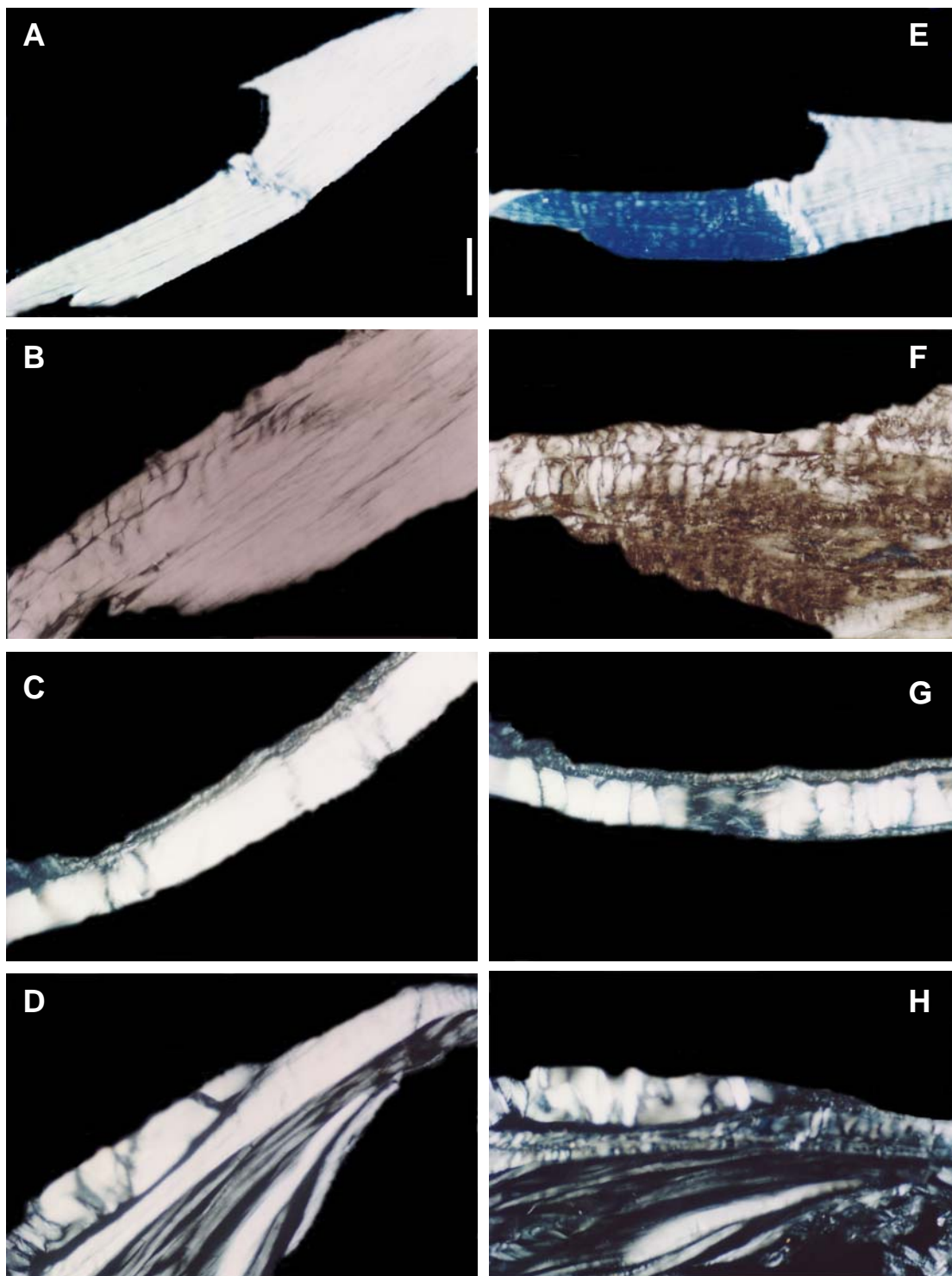


FIGURA 2:

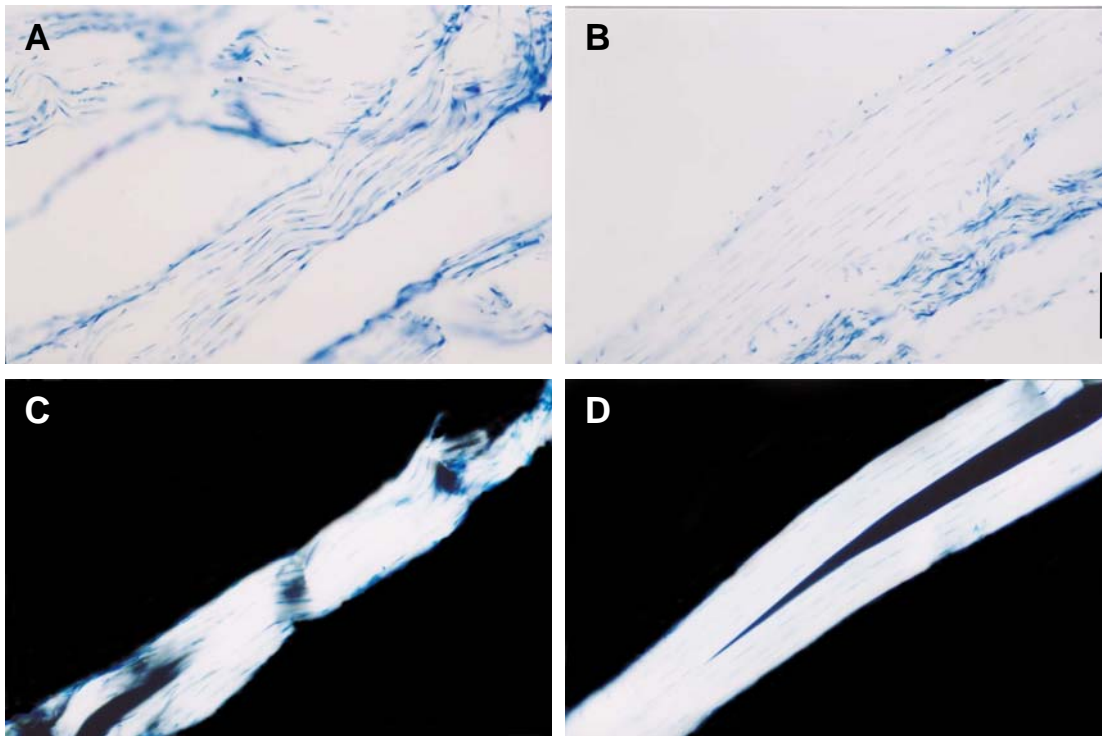


FIGURA 3:

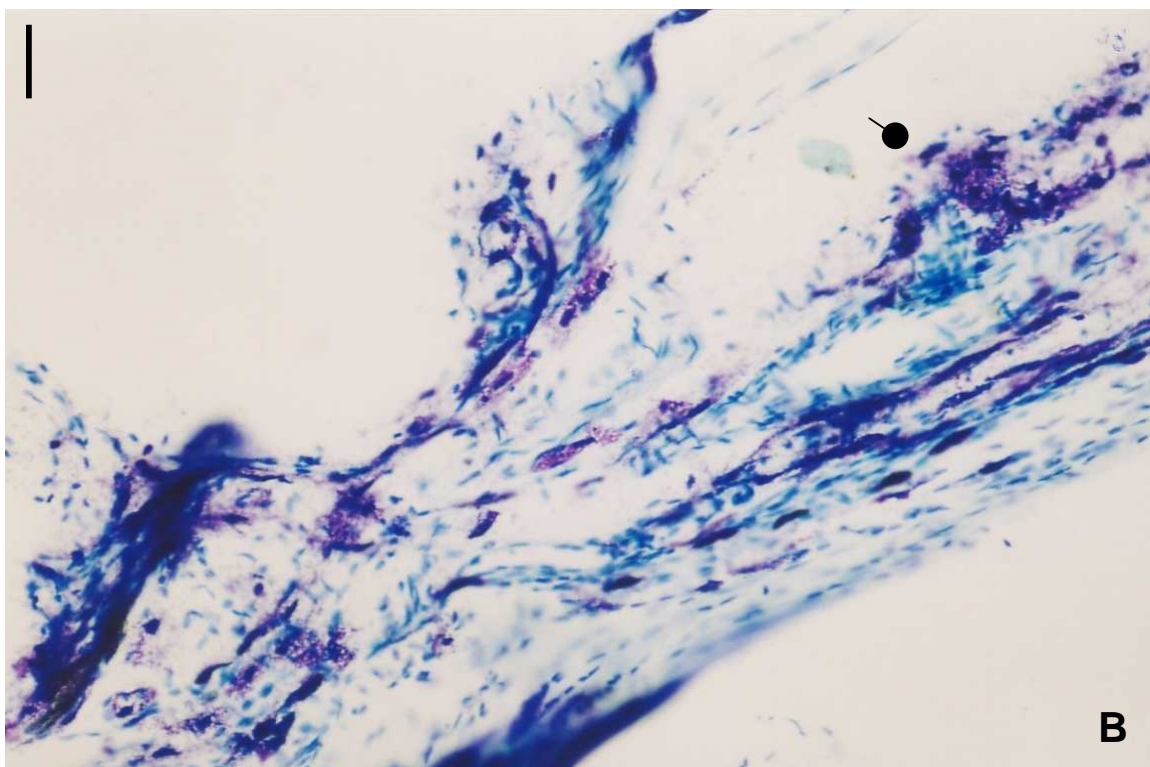
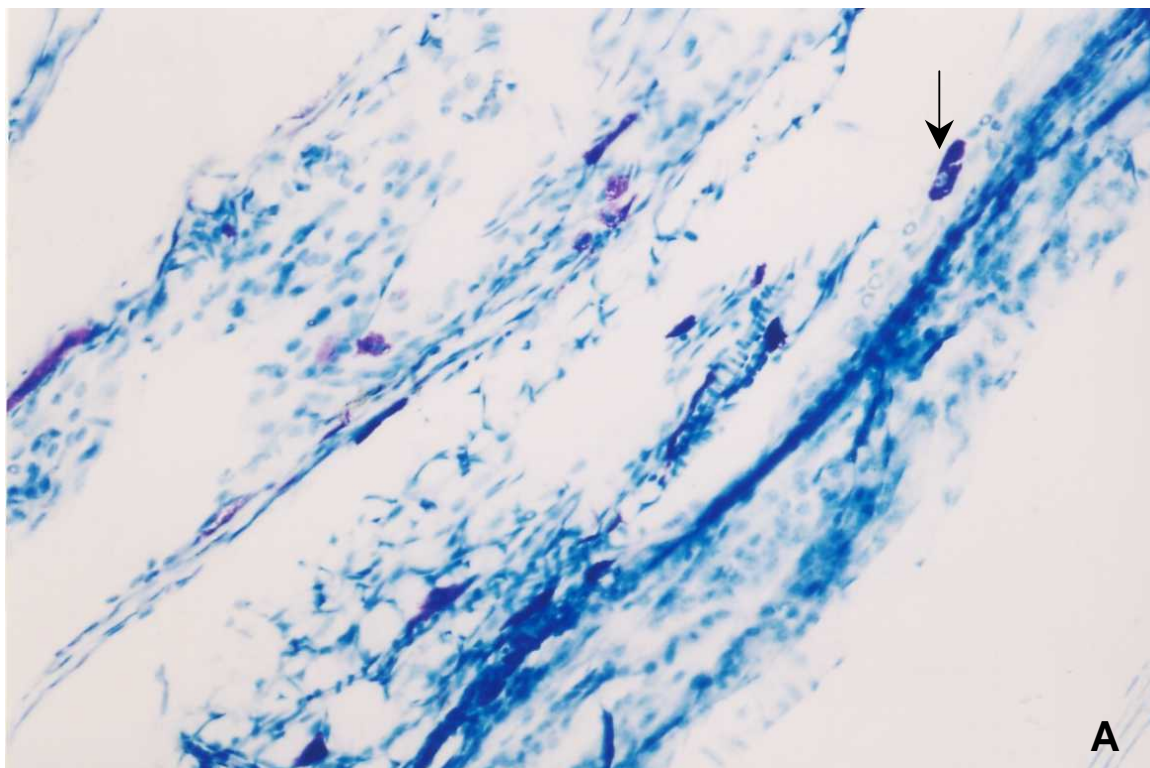
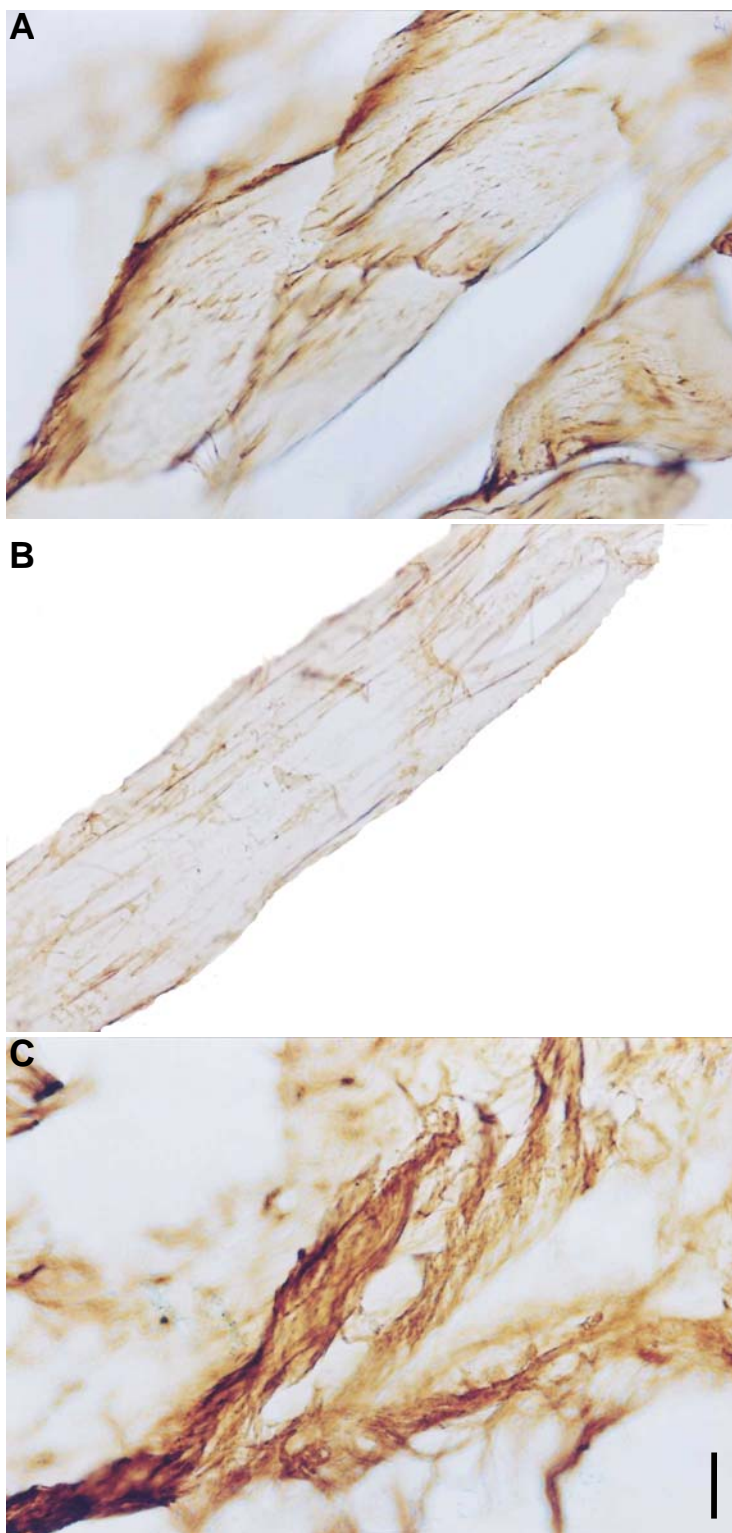


FIGURA 4:



LEGENDA DOS ANEXOS

Anexo 1: Anova para tendões do calcâneo de camundongos NOD *versus* tendões do calcâneo glicosilados *in vitro*. Medidas efetuadas em glicerina pura (birrefringência intrínseca).

Anexo 2: Anova para tendões da cauda de camundongos controle *versus* tendões da cauda de camundongos NOD e glicosilados *in vitro*. Medidas efetuadas em glicerina pura (birrefringência intrínseca).

ANEXO 1:

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0,00	0,00	0,00	0,995
Error	118	264,11	2,24		
Total	119	264,11			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+--
C NOD 100	60	11,798	1,187	(-----*-----)
C GS 100	60	11,800	1,752	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+--
Pooled StDev =	1,496			11,50 11,75 12,00 12,25

ANEXO 2:

One-way Analysis of Variance

Analysis of Variance

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	217,13	108,56	38,06	0,000
Error	231	658,88	2,85		
Total	233	876,00			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	-+-----+-----+-----+-----
T C 100	78	11,647	1,842	(--*--)
T NOD 100	78	10,446	1,662	(--*--)
T GS 100	78	9,287	1,549	(---*---)
				-+-----+-----+-----+-----
Pooled StDev =	1,689			9,0 10,0 11,0 12,0

**NUCLEAR PHENOTYPE AND CELL DEATH IN TENDON FIBROBLASTS OF
NON-OBESE DIABETIC (NOD) MICE**

Marcela Aldrovani Rodrigues¹, Maria Luiza Silveira Mello¹, Ana Maria Aparecida Guaraldo², and Benedicto de Campos Vidal¹, ¹Department of Cell Biology, Institute of Biology; ²Multidisciplinary Center of Biological Investigation, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Correspondence to:

Benedicto de Campos Vidal

Department of Cell Biology, Institute of Biology

State University of Campinas (UNICAMP)

PO Box 6109

13083-683 Campinas SP, Brazil

Tel: 55 19 3788-6123

Fax: 55 19 3788-6111

E-mail: vidal@unicamp.br

Abstract

Cells of the immune system of non-obese diabetic (NOD) mice are resistant to some factors that induce apoptosis in normal mice. However, it is not known whether a high resistance to apoptosis is also characteristic of non-immune cells in NOD mice and whether such changes are directly related to alterations in signal transduction from extracellular matrix via non-enzymatically glycosylated proteins, such as collagen. Glycosylated collagen interacts with receptors for advanced glycosylation endproducts to initiate a series of intracellular alterations that can modify the cell physiology or the induction apoptosis, as reflected by changes in the nuclear phenotype. In this work, we used the Feulgen reaction, image analysis, and the TUNEL test to examine alterations in the nuclear phenotype of fibroblasts from NOD mice compared with fibroblasts from healthy BALB/C mice, and assessed indications of apoptosis in these cells. The nuclear phenotype parameters analyzed were greater for NOD mice, indicating physiological differences between the fibroblasts of diabetic and normal mice. However, the TUNEL test was negative for fibroblasts from both groups of mice. These results indicate a very low frequency of DNA fragmentation, associated with apoptosis in fibroblasts from NOD mice. In normal mice, the frequency of such changes was significant.

Keywords: apoptosis, fibroblasts, non-enzymatic glycosylation, nuclear phenotypes

1. Introduction

Non-obese diabetic (NOD) mice develop diabetes following activation of multiple recessive *loci* and alterations in the mechanism of cell death in the immune system. The percentage of apoptotic cells in the immune system of NOD mice is 4.5 – 18%, compared to 28 – 61.7% in B6 mice [1]. NOD mice are resistant to some factors, including cyclophosphamide, that are capable of inducing apoptosis in other strains of mice [1].

It is unclear whether the high resistance to apoptosis in NOD mice is restricted to cells of the immune system, or if it is also characteristic of cells in other systems or tissues. In addition, it is unclear whether there is a direct relationship between apoptosis and possible alterations in the signal transduction of the extracellular matrix (ECM) for cells involved in the non-enzymatic glycosylation of extracellular proteins such as collagen. Hyperglycemia can generate intracellular osmotic stress through the activity of aldose reductase in the sorbitol pathway [2]. Senescent dermal fibroblasts are resistant to apoptosis [3, 4], which suggests that there is some incompatibility between the processes of cell death and senescence in these cells [5].

The autofluorescence and crystalline aggregation of collagen in diabetic patients and in animals with experimental diabetes differ from those of non-glycosylated collagen [6], because of the ability of fibroblasts to produce metalloproteinases and to form a glycosylated collagen gel [7]. In dermis, the non-enzymatic glycosylation that accompanies aging may enhance the degradation of

collagen, and reduce the proliferative capacity of fibroblasts exposed to degraded collagen *in vitro* [8].

Collagen interacts with fibroblasts through cell surface receptors to stimulate a cascade of intracellular events [9]. Glycosylated collagen also interacts with receptors for advanced glycosylation endproducts (AGEs) to modify the intracellular concentration of calcium ions. These ions are involved in a series of intracellular events, including gene transcription [10]. The activity of mitochondria ("apoptotic checkpoint") and of some endonucleases is also dependent on the homeostasis of calcium ions [11,12]. Recent studies have proposed that collagen type VI may represent an extrinsic pathway for regulating the activity of proteins involved in cell death [12].

In this work, we examined whether diabetes could affect the nuclear phenotypes of fibroblasts in collagen bundles of tail tendons of NOD mice compared with fibroblasts of non-diabetic mice. We also examined various aspects of cell death in tail and calcaneal tendon fibroblasts of these animals.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Ten female NOD mice (16 weeks old and in the fourth week of diabetes) and 10 female BALB/C mice (controls) of the same age were obtained from the

University's breeding colony. The mice were housed individually with free access to water and food in the Department of Cell Biology until used.

The mice were sacrificed by decapitation and the tarso-metatarsal joints and tail were removed. The tail tendons were either processed for histological analysis or were detached from the muscle and bone and fixed in acetic acid:ethanol (3:1, v/v for 15 min) and then rinsed in 80% ethanol and stained *en bloc* for Feulgen reaction.

The tail tendons and tarso-metatarsal joints for histological analysis were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2, under vacuum, for 2 h. The tissues were then transferred to a refrigerator where they were fixed for a further 24 h and then rinsed in distilled water for 4 h. The skin was subsequently removed and the tendons were detached from the muscle and bone.

The tendons were processed for routine inclusion in paraffin and sections 8 μm thick were used for the Feulgen reaction and TUNEL test. Sections of calcaneal tendons were used only in TUNEL test.

2.2. Feulgen reaction

Sections (8 μm thick) of tail tendons fixed in paraformaldehyde were treated with sodium borohydride for 7 min and then rinsed in distilled water. The treatment with borohydride was used to remove aldehyde groups created during fixation with paraformaldehyde, thereby moiling a false positive.

Histological sections and tendons *en bloc* were hydrolyzed in 4 M HCl for 90 min at 25°C and then rinsed with 0.1 M HCl to interrupt the hydrolysis. The tendons *en bloc* were subsequently squashed between a slide and coverslip and then frozen in liquid nitrogen followed by removal of the coverslip.

The material was then treated with Schiff reagent for 40 min in the dark and rinsed three times (5 min each) in sulfurous water. After a further rinse in distilled water and drying, the sections were cleared in xylol and mounted in natural Canada balsam. The mounted slides were stored in the dark.

2.3. Nuclear image analysis

The nuclei of tail tendon fibroblasts subjected to Feulgen reaction were analysed using a Carl Zeiss/Kontron image analyzer and software KS 400 (Oberkochen, Munich, Germany).

The preparations were observed with a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped with a Neofluar 40/0.75 objective, a 0.90 condenser and $\lambda = 546$ nm. The images were captured with a Sony CCD-IRIS/RGB Hyper HAD videocamera and relayed to a computer. Under these conditions, 1 μm corresponded to 5.77 pixels. The software supplied geometric, densitometric and textural data for the nuclei analyzed. The parameters used in this study included: nuclear area (μm^2), nuclear perimeter (μm), feret ratio (minimum feret / maximum feret as an indication of the degree of sphericity of the nuclei), optical density (OD, absorbance) integrated

optical density (IOD, Feulgen-DNA content), SDtd (standard deviation of the total densitometric values for the nuclei, or variability of the nuclear absorbance as a reflection of the variation in the state of chromatin packing), and entropy ($E = k \cdot \log_e n$, where n = number of informative data). The entropy was calculated in pixels to provide images of the nuclei. The conversion to a gray scale for absorbance or transmittance and the statistical comparisons were done using the Minitab program.

2.4. TUNEL test

The calcaneal and tail tendons fixed in paraformaldehyde were examined for DNA fragmentation using the TUNEL assay, as described by the manufacturer (Roche/Amersham). Since the UTP was labeled with fluorescein, anti-fluorescein antibodies coupled to peroxidase were incubated with 3-3'-diaminobenzidine (Fluka) for 10 min at room temperature. Counter-staining was done with methyl green (Merck), followed by rinsing in distilled water. The tendons were air dried and mounted in natural Canada balsam. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H_2O_2 in absolute methanol for 30 min at room temperature. A negative control was done by excluding the TdT enzyme from the reaction. Vero cells cultured for 72 h were used as a positive control.

3. Results

3.1. Feulgen reaction and image analysis

The Feulgen reaction revealed no morphological differences between the nuclei of tendon fibroblasts from healthy and diabetic mice. Similarly, there were no significant differences between the nuclei of histological sections and of preparations obtained by squashing of the tendons. The fibroblast nuclei were elongated and thin, and were distributed along the tendons (Fig.1 A-E). Analysis of the nuclear geometric parameters (area, perimeter and feret ratio) indicated greater values for nuclei from NOD mice (Table 1). The greater nuclear area and perimeter were confirmed by non-parametric Mann-Whitney test (nuclear area: $\eta = 23.040$ for control mice and 26.400 for NOD mice; perimeter: $\eta = 29.790$ for control mice and 33.460 for NOD mice; $\alpha = 0.000$). However, there was no significant difference in the feret ratio of the two groups of nuclei ($\eta = 0.180$ for control mice and 0.180 for NOD mice; $\alpha = 0.05$). A significant difference was observed for the OD and IOD values (Table 1) (OD: $\eta = 0.320$ for control mice and 0.463 for NOD mice; IOD: $\eta = 7.100$ for control mice and 12.965 for NOD mice; $\alpha = 0.000$).

When the Feulgen-DNA values were plotted against nuclear areas, four subgroups of nuclei were discriminated (Fig. 2 A-B). The subgroup with IOD 1-5 contained fibroblasts undergoing cell death, while the other subgroups corresponded to fibroblasts with diploid nuclei (5.1-10), fibroblasts in the S phase

of the cell cycle (10.1-20) and fibroblasts that were possibly polyploid (>20). In the controls the nuclear area showed a significant positive correlation with the IOD (R-Sq = 89.2%) that was greater than for NOD mice (R-Sq = 53.6%).

The frequency of tendon fibroblasts undergoing apoptosis in NOD mice (2.3%) was significantly less than in control mice (38%).

The SDtd and entropy values for NOD mice were significantly greater than for control mice (SDtd: $\eta = 14.725$ for control mice and 22.140 for NOD mice; entropy: $\eta = 5.660$ for control mice and 6.170 for NOD mice; $\alpha = 0.000$).

3.2. TUNEL Test

TUNEL test was negative for fibroblasts from NOD and BALB/C mice (Fig. 1 F-I) and positive for Vero cells cultured for 72 h (Fig. 1 J-K)

4. Discussion

The results of this work, especially the image analysis of tendons subjected to the Feulgen reaction, indicated a very low frequency (2.3%) of DNA fragmentation, probably associated with apoptosis, in fibroblasts of NOD mice when compared with fibroblasts from control BALB/C mice (38%).

Although the TUNEL test did not detect DNA fragmentation associated with apoptosis in the fibroblasts of control tendons, the Feulgen-DNA results suggested

that this phenomenon occurred in the control mice. Recent studies of collagen type VI have proposed that collagen-cell interactions could be involved in activating the protein GTPase RAC, which modulates the production of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria, and in controlling the expression of the Bcl₂ family of proteins that regulates the activation of procaspases [12]. The prevalence of TUNEL-positive nuclei in the retina of diabetic mice is much less than in diabetic rats [13].

The Feulgen reaction in association with image analysis has been used to evaluate textural modifications in the chromatin of different cell types [13-19]. Preparations stained by the Feulgen reaction have been used to determine mitotic and apoptotic indices [20] and to establish the relationships between the cell cycle and apoptosis [21].

Image analysis of nuclei stained by the Feulgen reaction can reveal changes in the supraorganization of chromatin [17, 18], and in DNA during apoptosis [15,19]. Similarly, alterations in the supraorganization of chromatin induced by stressful conditions such as thermal shock, starvation, exposure to heavy metals, gamma radiation and viral infection can be detected by the Feulgen reaction in association with image analysis [14, 22-25]. The degree of ploidy, which reflects the physiological activity of an organ, can also be assessed by this approach.

The increase in the OD and IOD values, and in the nuclear area and perimeter in fibroblasts from NOD mice suggested that there were differences in the nuclear physiological activity of these cells compared to the controls. Such differences may reflect modifications in the signal transduction of the ECM of these

cells caused by the non-enzymatic glycosylation of collagen. The interaction of components of the EMC with cells is an important factor in determining cell morphology, differentiation, and migration, and in the intracellular movement of macromolecules [26].

The difference in the correlation between the nuclear area and the IOD values for control and NOD mice further confirmed that the tendon fibroblasts of these animals differed physiologically. In addition, the SDtd values showed that the chromatin of NOD fibroblasts was more heterogeneous than that of the controls.

The fact that there were no visual differences in the nuclear phenotypes between histological sections and preparations stained *en bloc* and then gently squashed indicated that the treatment with borohydride was efficient. The TUNEL test was not used with the squashed material since this procedure leads to the rupture of collagen fibers, all of which then stain for peroxidase (B.C. Vidal, personal observations). Fixation in 4% paraformaldehyde was used here for the tendons because previous work had shown that this fixative produced the least interference with the TUNEL test [27].

5. Acknowledgements

This work was supported by CAPES and the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq).

6. Reference

- [1] F. Colucci, M.L. Bergman, C. Penha-Gonçalves, C.R. Cilio, D. Holmberg, Apoptosis resistance of non-obese diabetic peripheral lymphocytes linked to the Idd 5 diabetes susceptibility region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94** (1997), 8670-8674.
- [2] D.S. Zatecka Jr, P.F. Kador, S. Garcia-Castinêiras, M.F. Lou, Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *Am. Diab. Assoc. Inc* **52** (2003), 1023-1042.
- [3] E. Wang, Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress Bcl2 is involved, *Cancer Res*. **55** (1995), 2284-2292.
- [4] V. Chaturverdi, J.Z. Qin, M.F. Denning, D. Choubey, M.O. Diaz, B.J. Nickoloff, Apoptosis in proliferating, senescent and immortalized keratinocytes, *J. Biol. Chem*. **274** (1999), 23358-23367.
- [5] W. Wang, F. Brégégère, Y. Soroka, A. Kayat, G. Redziniak, Y. Milner, Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes, *Mechan. Ageing Develop*. **125** (2004), 237-249.
- [6] T.T. Andreassen, H. Oxlund, C.C. Danielsen, The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reactions products on the mechanical properties of rat tail tendons, *Connect. Tissue. Res*. **17** (1988), 1-9.
- [7] L. Rittie, A. Berton, J.C. Monboisse, W. hornebeck, P. Gillery, Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix

- metalloproteinase production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264** (1999), 488-492.
- [8] J. Varani, D. Spearman, P. Perone, Fligiel, S.E. Fligiel, S.C. Datta, Z.Q. Wang, S. Shao, G.J. Fisher, J.J. Voorhees, Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degrades collagen in vitro, *Am. J. Pathol.* **158** (2001), 931-942.
- [9] M. Chiquet, A.S. Renedo, F. Huber, M. Flück, How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol.* **22** (2003), 73-80.
- [10] N.B. Bishara, M.E. Dunlop, T.V. Murphy, I.A. Darby, M.A.S. Rajanayagam, M.A. Hill, Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca^{++} signaling in endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* **198** (2002), 80-92.
- [11] W.E. Horton Jr, L. Feng, C. Adamns, Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease, *Matrix Biol.* **17** (1998), 107-115.
- [12] R. Rizzuto, The collagen-mitochondria connection, *Nat. Genet.* **35** (2003), 300-301.
- [13] V. Asnaghi, C. Gerhardinger, T. Hoehn, A. Adeboje, M. Lorenzi, A role for the pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat, *Am. Diabetes Assoc. Inc* **52** (2003), 506-511.
- [14] M.L.S. Mello, Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*, *Rev. Bras. Genet.* **12** (1989), 485-498.

- [15] M.L.S. Mello, Discrimination of Feugen-stained apoptotic nuclei by image analysis, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **40** (1999), 691 (abstract).
- [16] M.L.S. Mello, J. Russo, Image analysis of Feugen-stained c-H-ras-transformed NIH/3T3 cells, *Biochem. Cell Biol.* **68** (1990), 1026-1031.
- [17] M.L.S. Mello, S. Contente, B.C. Vidal, W. Planding, U. Schenck, Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis, *Exp. Cell Res.* **220** (1995), 374-382.
- [18] B.C. Vidal, J. Russo, M.L.S. Mello, DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis, *Exp. Cell. Res.* **244** (1998), 77-82.
- [19] S.S. Maria, B.C. Vidal, M.L.S. Mello, Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis, *Genet. Mol. Biol.* **23** (2000), 109-112.
- [20] L. Camby, L. Salmon, A. Dauguy, J.L. Pasteels, R. Kiss, The use of the digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei to detect apoptosis, *Histochem. Cell. Biol.* **104** (1995), 407-417.
- [21] F. Wallet, H. Gérard, P.M. Martin, C. Dussert, Toward a new method to in situ study of apoptosis and its relations in cell cycle. *Cytometry* **25** (1996), 263-270.
- [22] M.L.S. Mello, F.S. Kubrusly, M.A.F. Randi, V.L.C.C. Rodrigues, A.N. Ferraz Filho, Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entom. Exp. Appl.* **74** (1995), 209-218.

- [23] M.L.S. Mello, M.C.H. Tavares, M.M. Dantas, V.L.C.C. Rodrigues, S.S. Maria-Engler, S.P. Campos, N.L. Garcia, Cell death and survival alterations in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock, *Biochem. Cell Biol.* **79** (2001), 709-717.
- [24] M.L.S. Mello, I. Koseki, Nuclear phenotypes and DNA content in GBK cell line infected with viruses of Aujeszky's disease and bovine diarrhoea. *Cytobios* **96** (1998), 111-121.
- [25] A.S. Moraes, B.C. Vidal, A.M.A. Guaraldo, M.L.S. Mello, Chromatin organization and extensability in mouse hepatocytes following starvation and refeeding, Subm. for publication.
- [26] R.E. Gilbert, A. Cox, M. Dziadek, M.E. Cooper, G. Jerums, Extracellular matrix and its interactions in the diabetic kidney: a molecular biological approach, *J. Diab. Compl.* **9** (1995), 252-254.
- [27] L. Dubská, E. Matalova, I. Misek, Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation, *Acta Veter. BRNO.* **71** (2002), 529-533.

Table 1

Image analysis of Feulgen-stained fibroblasts

Mice	n	Area (μm^2)		Perimeter (μm)		Ferret ratio		OD		IOD		SDtd		Entropy	
		\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
<i>BALB/C</i>	310	22.75	12.76	31.38	12.51	0.19	0.07	0.32	0.05	7.48	4.56	15.56	5.51	5.64	0.47
<i>NOD</i>	129	28.55	10.80	35.50	10.99	0.22	0.11	0.49	0.14	13.68	4.72	22.38	7.92	6.10	0.50

IOD = integrated optical density (Feulgen-DNA values); n = number of cells measured; OD = optical density; Feret ratio = minimum feret / maximum

feret; SD = standard deviation; SDtd = standard deviation of the total densitometric values for the nucleus; \bar{X} = mean

FIGURE CAPTIONS

Fig.1. A-I. Fibroblasts from NOD (A, E, G, I) and BALB/C mice (B-D, F, H) stained by the Feulgen reaction (A-E) and TUNEL test (F-I). **A-G.** Tail tendon fibroblasts. The TUNEL test was negative for fibroblasts. **H-I.** Calcaneal tendon fibroblasts. The TUNEL test was negative for fibroblasts. **J-K.** Vero cells cultured for 72 h and showing a positive response to the TUNEL test. Bar: 25 μm (A, C, E); 100 μm (B); 10 μm (D, F, G-K).

Fig. 2. Relationship between the nuclear area and the integrated optical density (IOD) values for Feulgen-stained DNA in tendon fibroblasts of BALB/C (A) and NOD (B) mice. 0-5 = subgroup of fibroblasts possibly in cell death, 5.1-10 = subgroup of fibroblasts with diploid nuclei, 10.1-20 = subgroup of fibroblasts in S phase of cell cycle, 20-30 = subgroup of fibroblasts with possibly polyploid nuclei.

FIG.1:

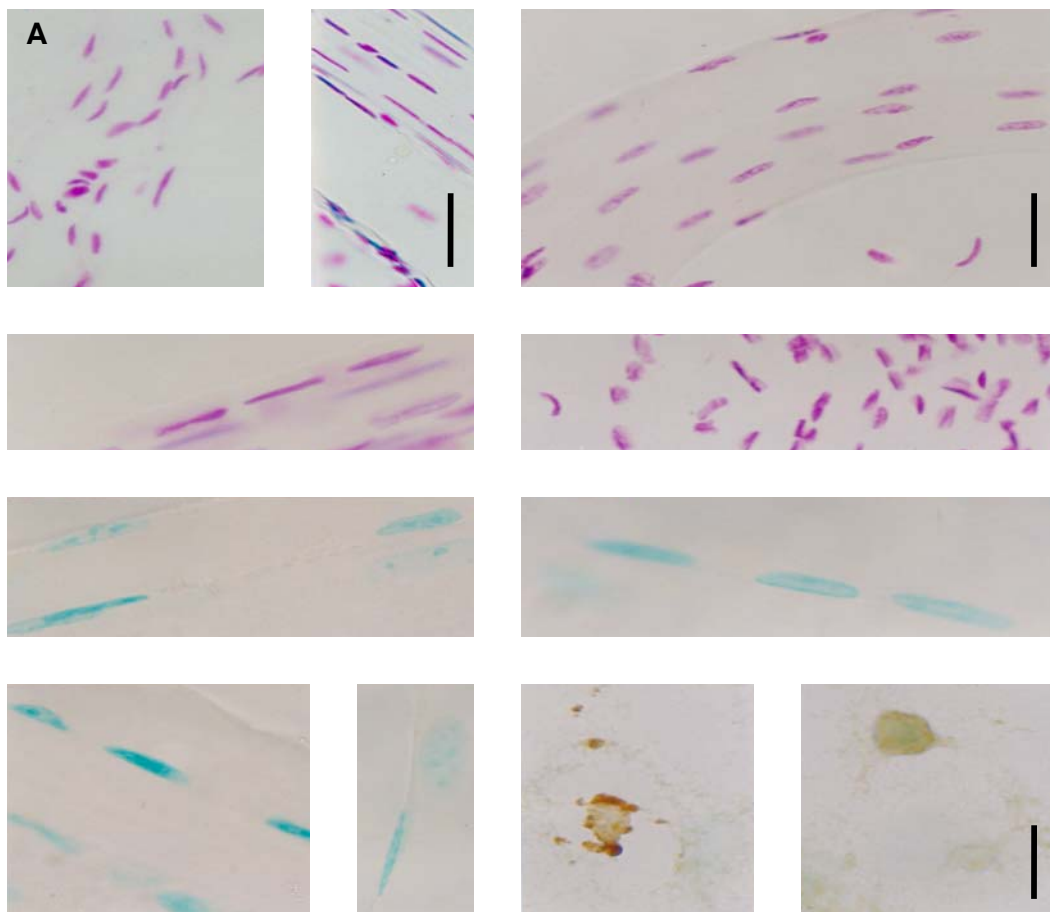
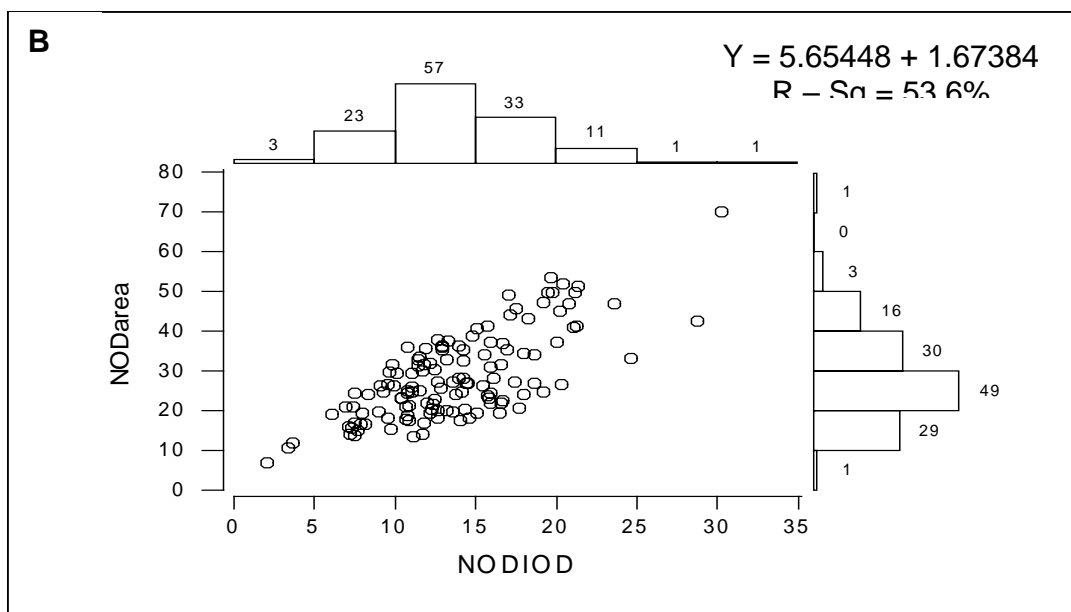
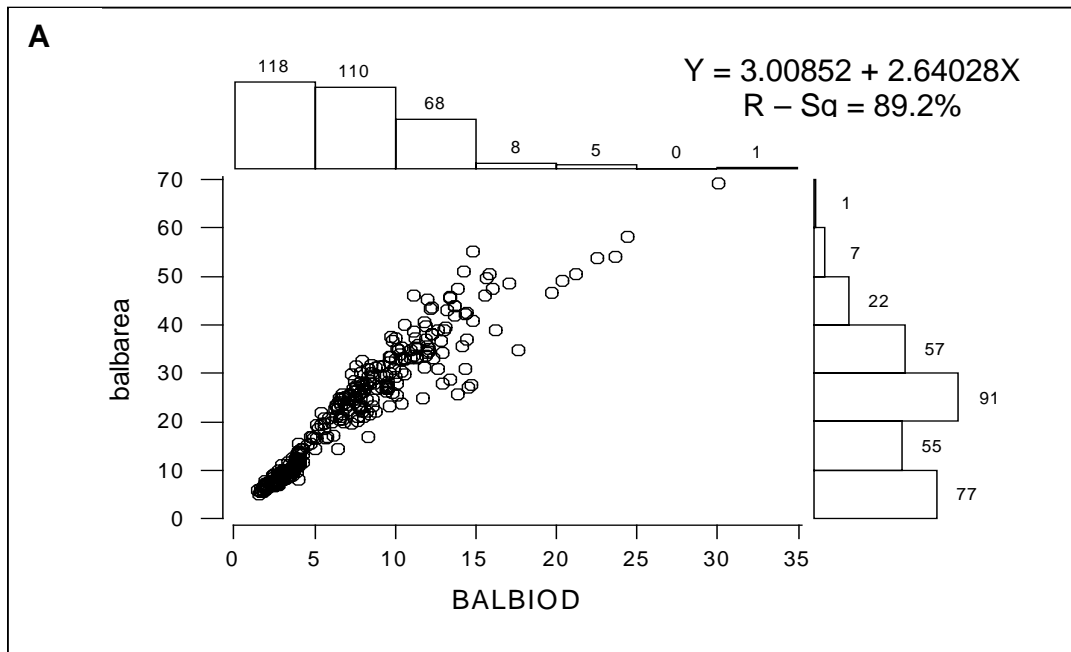


FIG.2:



CONCLUSÕES GERAIS

- A glicosilação realizada *in vitro* mostrou-se mais eficiente do que a glicosilação *in vivo* observada em camundongos NOD na quarta semana de expressão do diabetes.
- A glicosilação não-enzimática do colágeno aumenta o número de ligações cruzadas intermoleculares. Com isso, as fibras de colágeno se tornam mais alinhadas, estáveis e com condições de empacotamento molecular mais intensas quando comparadas ao controle.
- As alterações de birrefringência intrínseca provocadas pelo diabetes evidenciam a ocorrência de modificações nos níveis de cristalinidade do colágeno.
- O passo da hélice do colágeno influencia nas alterações de cristalinidade induzidas pela glicosilação não-enzimática decorrente do diabetes.
- Em tendões de camundongos NOD, a glicosilação não-enzimática decorrente do diabetes não causa decréscimo no conteúdo de glicosaminoglicanos da matriz extracelular e não afeta a capacidade de ligação do corante azul de toluidina pH 4.0 a estas macromoléculas.
- Toda a glicose incorporada não-enzimaticamente, pelo processo realizado *in vitro*, aos feixes de colágeno de tendões da cauda de camundongos foi convertida a produtos de Amadori, i.e., não permaneceu disponível para ligação à Concanavalina Br.

- O tampão fosfato em NaCl que, freqüentemente, é usado para lavar fragmentos de tecidos a serem intumescidos introduz falsas estabilizações ao tecido através de ligações eletrostáticas com grupos aniônicos disponíveis no tecido.
- Feixes de colágeno glicosilados *in vitro* ou pelo diabetes são mais resistente à extração em ácido acético a 3% quando comparados aos feixes de colágeno de animais sadios.
- O aumento nos valores de OD e IOD, na área e perímetro nuclear e nos níveis de ploidia mais as diferenças de dependência da área nuclear em função da IOD observados em fibroblastos de camundongos NOD evidenciam a existência de diferenças na atividade nuclear destes em relação ao controle.
- A cromatina dos núcleos de fibroblastos de camundongos NOD é mais heterogênea em relação ao controle.
- Os dados referentes à análise de imagem de tendões submetidos à reação de Feulgen, indicam uma freqüência muito baixa de fragmentação de DNA, provavelmente ligada à apoptose, em fibroblastos de camundongos NOD e não identificável com o teste de TUNEL.

O diabetes alterou a ordem molecular (cristalinidade) e o estado de agregação ordenada dos feixes de colágeno, principal constituinte, dos tendões estudados. Alterações relacionadas ao colágeno são particularmente importantes,

uma vez que essa proteína representa cerca de 30% do total das proteínas do organismo humano, e possui inúmeras funções e ampla distribuição anatômica. Tais alterações comprometem o metabolismo da matriz extracelular e a transdução de sinais do colágeno para os fibroblastos que, então, tendem a adequar seus mecanismos de síntese e exportação ao estímulo recebido. Modificações nos mecanismos de síntese e exportação dos fibroblastos se refletem no fenótipo nuclear e no índice apoptótico dessas células, e prejudicam a integridade biomecânica do tecido e da estrutura.

REFERÊNCIAS GERAIS (de acordo com a ABNT)

ALVÁRES, R.S. & MELLO, M.L.S., 1987. Alterações nos fenótipos nucleares de células somáticas com diferentes graus de ploidia em espécimes de *Triatoma infestans* submetidos à radiação. Ciênc. Cult. S. Paulo (Suppl), 39:778-779.

AKAGI, K., PIAO, G., KANEKO, S., SAKAMAKI, K., SHIRAKAVA, H., KYOTAMI, M., 1998. Helical polyacetylene synthesized with a chiral nematic reaction field. Science, 282:1683-1686.

ANDRADE, C.G.T. & MELLO, M.L.S., 1987. Phenotypes and number of Malpighin tubule nuclei in *Triatoma infestans* Klug along development and starvation. Rev. Bras. Genét., 10:449-457.

ANDREASSEN, T.T., OXLUND, H., DANIELSEN, C.C., 1988. The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. Connective Tissue Reserch, 17:1-9.

ASNAGHI, V., GERHARDINGER, C., HOEHN, T., ADEBOJE, A., LORENZI, M., 2003. A role for the pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. American diabetes Association, Inc 52(2):506-511.

ATHENSTAED, H., 1974. Pyroelectric and piezoelectric properties of vertebrates. Ann. NY acad. Sci., 238:68-94.

BAER, E.T., GATHERCOLE, L.J., KELLER, A., 1974. Structure hierarchies in tendon collagen: an interim summary. In: Atkins, E.T., Keller, A. (Eds.), Structure of Fibrous Biopolymers, Proceeding of the Colston Research Society, University of Bristol, 189-195.

BAILEY, A.J., PAUL, R.G., KNOTT, L., 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. In: Mechanisms of Ageing and Development. 106:1-2:1–56.

BAKERMAN, S., 1964. Distribution of the α - and β - components in human-skin collagen with age. Biochim. Biophys. Acta, 90:621-623.

BENNET, H.S., 1967. The microscopical investigation of biological materials with polarized light. In: Jones, R.M., (Ed.), McClung's Handbook of Microscopical Technique, Hafner Publishing Co, New York, 591-677.

BERGERON, J.A. & SINGER, M., 1958. Metachromasy: an experimental and theoretical reevaluation. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4:433-457.

BIRCH, H.L., BAILEY, A.J., GOODSHIP, A.E., 1998. Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. Equine Veterinary Journal, 30(6):534-539.

BISHARA, N.B., DUNLOP, M.E., MURPHY, T.V., DARBY, I.A., RAJANAYAGAM, M.A.S., HILL, M.A., 2002. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca^{++} signaling in endothelial cells. Journal of Cellular Physiology, 198:80–92.

BRASS, L.F. & BENSUSAN, H.B., 1976. On the role of the hydrate residues in the platelet-collagen interaction. Biochem. Biophys. Acta, 444:43-52.

BROWNLEE, M., CERAMI, A., VLASSARA, H., 1988. Advanced glycosylation endproducts in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N. Eng. Med., 318:1315-1321.

CAMBY, L., SALMON, L., DAUGUY, A., PASTEELS, J.L., KISS, R., 1995. The use of the digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei to detect apoptosis. *Histochem. Cell Biol.*, 104:407-417.

CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R., 1980. *Biophysical Chemistry II: techniques for the study of biological structure and function*, ed. By Freemann, W.H., San Francisco.

CASSIM, J.Y. & TAYLOR, E.W., 1965. Intrinsic birefringence of poly- γ -benzyl-L-glutamate, a helical polypeptide, and the theory of birefringence. In: *Biophys. J.*, 5:532–552.

CASSIM J.Y. & TOBIAS, O.S., 1968. Birefringence of muscle proteins and the problem of structural birefringence. *Biochim. Biophys. Acta*, 168:463–471.

CHAKRAVARTI, S., MAGNUSON, T., LASS, J.H., JEPSEN, K.J., LAMANTIA, C., CARROLL, H., 1998. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell. Biol.* 141(5):1277-1285.

CHATURVEDI, V., QIN, J.Z., DENNING, M.F., CHOUBEY, D., DIAZ, M.O., NICKOLOFF, B.J., 1999. Apoptosis in proliferating, senescent and immortalized keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 274:23358-23367.

CHIQUET, M., RENEDO, A.S., HUBER, F., FLÜCK, M., 2003. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biology*, 22:73-80.

COLUCCI, F., BERGMAN, M.L., PENHA-GONÇALVES, C., CILIO, C.R., HOLMBERG, D., 1997. Apoptosis resistance of non-obese peripheral lymphocytes linked to the Idd 5 diabetes susceptibility region. *PNAS*, 94(16):8670–8674.

CHRISTNER, J., BROWN, M.L., DZIEWIATBOSKI, D.D., 1978. Affinity binding of the cartilage proteoglycan protein-keratan sulfate core to the immobilized hyaluronic acid. *Analyt. Biochem.*, 90:22-32.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 329:977-986.

DIAMANT, J., KELLER, A., BAER, E., LITT, M., ARRIDGE, R.G.C., 1972. Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as function of ageing. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 180: 293-315.

DICKERSON, R.E. & GEIS, I., 1969. The structure and action of proteins. Harper & Row, Publishers/New York. p. 1-120, pp.12.

DUBSKÁ, L., MATALOVA, E., MISEK, I., 2002. Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. *Acta Veter. BRNO*, 71:529-533.

FREY-WISSLING, A., 1948. *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives*. Elsevier, Amsterdam, 194-206.

FUKADA, E., 1974. Piezoelectric properties of organic polymers. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 238:7-25.

GATHERCOLE, L.J. & KELLER, A., 1974. Light microscopic waveforms in collagenous tissues and their structural implications. In: Structure of Fibrous Biopolymers. Atkins EDT, Keller A. ed. Proceedings of the Colston Research Society-University of Bristol. pp.153-187.

GILBERT, R.E., COX, A., DZIADEK, M., COOPER, M.E., JERUMS, G., 1995. Extracellular matrix and its interactions in the diabetic kidney: a molecular biological approach. J. Diab. Compl., 9:252-254.

GLIMCHER, M.J. & KRANE, S.M., 1968. The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification. Treatise on Collagen, Gould, B.S.(edit.) 2:76-77.

GOLDBERG, B., 1979. Binding of soluble type I collagen molecules to the fibroblasts plasm membrane. Cell, 16:265-275.

GOLDBERG, B.D. & BURGESSON, R.E., 1982. Binding of soluble types I collagen to fibroblasts: specificities for native collagen types, triple helical structure, telopeptides properties and cyanogen bromide-derived peptides. J. Biol. Chem., 95:752-756

HAY, E.D., 1981. Extracellular matrix. J. Cell. Biol., 91(3):205-223.

HALE, A.J., 1958. The interference microscope in biological reserch. E&S. Livingstone LTD, Edinburgh and London, pp.74-76.

HEDGE, P.S., CHANDRAKASAN, G., CHANDRA, T.S., 2002. Inhibition of collagen glycation and crosslinking *in vitro* by methanolic extracts Finger millet (*Eleusine coracana*) and Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*). The Journal of Nutritional Biochemistry, 13(9):517-521.

- HORTON JR, W.E., FENG, L., ADAMNS, C., 1998. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biology*, 17:107-115.
- HYNES, R.O., 1986. Fibronectins. *Sci. Am.*, 253(6);32-41.
- JAWORECK, T., NEHER, D., WIRINGA, R.H., SCHOUTEN, A.J., 1998. Electromechanical properties of an ultrathin layer of directionally aligned helical polypeptides. *Science*, 279:57-60.
- KIERNAN, J.A., 1990. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. Pergamon Press. Oxford, pp.8; pp.150.
- KOHN, R.R. & ROLLERSON, E., 1959. Studies on the effect of heat and age in decreasing ability of human collagen to swell in acid. *J. Geront.*, 14:11-15.
- KOOB, T.J. & VOGEL, K.G., 1987. Site-related variations in glycosaminoglycan content and swelling properties of bovine flexor tendon. *J. Orthop. Res.*, 5:414-424.
- LANDOWNE, D., 1985. Molecular motion underlying activation and inactivation of sodium channels in squid giant axons. *J. Membrane Biol.*, 88:171-185.
- LEHN, J.M., 2002. Toward self-organization and complex matter. *Science*, 295:2400-2402.
- LEONARDI, L., RUGGIERE, A., ROVERI, N., BIGI, A., REALE, E., 1983. Light microscopy, electron microscopy, and X-ray diffraction analysis of glycerinated collagen fibers. *J. Ultrastruct. Res.*, 85:228-237.
- LIEN, Y.H., STERN, R., FU, J.C.C., SIEGEL, R.C., 1984. Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent cross-linking by glucose. *Science*, 225:1489-1491.

- LISON, L., 1960. Histochemie et Cytochimie Animales: Principes et Methodes. Gauthier-Villar. Paris. pp.293-294; pp.415-417; pp.523.
- MAGNUSSON, S.P., AAGAARD, P., ROSAGER, S., DYHRE-POUELSEN, P., KJAER, M., 2001. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis in vivo. *J. Physiol.*, 531:277-288.
- MARIA, S.S., VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S., 2000. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1):109-112.
- MELLO, M.L.S., 1983. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Histochem, J.*, 15:739-751.
- MELLO, M.L.S., 1989. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.*, 12:485-498.
- MELLO, M.L.S., 1999. Discrimination of Feulgen-stained apoptotic nuclei by image analysis. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40:691 (abstract).
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochem*, 18:103-122.
- MELLO, M.L.S., GODO, C., VIDAL, B.C., ABUJADI, J.M., 1975. Changes in macromolecular orientation on collagen fibers during the process of tendon repair in the rat. *Ann. Histochem*, 20:145-152.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., CARVALHO, A.C., CASEIRO-FILHO, A.C., 1979. Change with age of anisotropic properties of collagen bundles. *Gerontology*, 25:2-8.

MELLO, M.L.S., RUSSO, J., 1990. Image analysis of Feulgen-stained c-H-ras-transformed N1H/3T3 cells. *Biochem. Cell Biol.*, 68:1026-1031.

MELLO, M.L.S., CONTENTE, S., VIDAL, B.C., PLANDING, W., SCHENCK, U. 1995a. Modulation of *ras* transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Exp. Cell. Res.*, 220:374-382.

MELLO, M.L.S., KUBRUSLY, F.S., RANDI, M.A.F., RODRIGUES, V.L.C.C., FERRAZ FILHO, A.N., 1995b. Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entom. Exp. Appl.*, 74:209-218.

MELLO, M.L.S. & KOSEKI, I., 1998. Nuclear phenotypes and DNA content in GBK cell line infected with viruses of Aujeszky's disease and bovine diarrhoea. *Cytobios*, 96:111-121.

MELLO, M.L.S., TAVARES, M.C.H., DANTAS, M.M., RODRIGUES, V.L.C.C. MARIA-ENGLER, S.S., CAMPOS, S.P., GARCIA, N.L., 2001. Cell death and survival alterations in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* following heat shock. *Biochem. Cell. Biol.*, 79:709-717.

MENTINK, C.J.A.L., HENDRIKS, M., LEVELS, A.A.G., WOLFFENBUTTEL, B.H.R., 2002. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clinica Chimica Acta*, 321:69-76.

MONNIER, V.M., 1989. Mailard theory of ageing. In: BAYNES, J.W., MONNIER, V.M. (Eds.), *The Mailard reaction in aging, diabetes, and nutrition*. Alan R. Liss, New York, pp.1-22.

MORAES, A.S., VIDAL, B.C., GUARALDO, A.M.A., MELLO, M.L.S., 2004. Chromatin organization and extensibility in mouse hepatocytes following starvation and refeeding. Subm. for. publication.

NORDÉN, B., 1978. Applications of linear dichroism spectroscopy. *Appl. Spectr. Rev.*, 14:157–248.

ODETTI, P., ARAGNO, I., ROLANDI, R., GARIBALDI, S., VALENTINI, S., OSSO, L., TRAVERSO, N., COTTALASSO, D., PRONZATO, M.A., MARINARI, U.M., 2000. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils: role of protein glycation. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 16 (2):74-81.

ORIEL, P.J. & SCHELLMAN, J.A., 1966. Studies of the birefringence dispersion of polypeptides and proteins. *Biopolymers*, 4:469–494.

PATERSON-KANE, J.C., FIRTH, E.C., GOODSHIP, A.E., PARRY, D.A., 1997. Age-related differences in collagen crimp patterns in the superficial digital flexor tendon core region of untrained horses. *Aust. Vet. J.*, 75: 39-44.

PAUL, R.G. & BAILEY, A.J., 1996. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28:1297-1310.

PIEZ, K.A., 1984. Molecular and aggregate structures of the collagens. In: Piez, K.A., Reddi, A.H., eds. *Extracellular matrix biochemistry*. New York: Elsevier Sci. Publishing Co., Inc., 24-26.

PIMENTEL, E.R. & VIDAL, B.C., 1990. Interaction of concanavalin A with sugar residues of collagen from different tissues. *Rev. Brasil. Biol.*, 50(3):689-693.

POLICARD, A. & COLLET, A., 1961. Physiologie du tissu conjonctive. Normal et Pathologique. Masson et C^{ie}. Paris. pp.94.

REDDY, G.K., STEHNO-BITTEL, L., ENWEMEKA, S., 2002. Glycation-induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon. Archives of Biochemistry and Biophysics, 399:174-180.

RITTIE, L., BERTON, A., MONBOISSE, J.C., HORNEBECK, W., GILLERY, P., 1999. Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 264:(2)488-492.

RIZZUTO, R., 2003. The collagen-mitochondria connection. Nature Genetics, 35:300-301.

ROTH, S. & FREUND, I., 1982. Second harmonic generation and orientational order in connective tissue: a mosaic model for fibril orientational ordering in rat-tail tendon. J. Appl. Cryst., 15:72–78.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J.J., CAVADA, B.S., 1997. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. FERS Letters. 114-118.

SCHMIDT, W.J., 1937. Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. G. Borntrager.

SCHMIDT, W.J. & KEIL, A., 1958. Die gesunden und die erkrankten Zahngewebe des Menschen und der Wirbeltiere unter dem Polarisationsmikroskop. Carl Hansen.

SCHNIDER, A.M. & KOHN, R.R., 1982. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Exp. Geront.* 17:185-194.

SILBERMANN, M. & FROMER, J., 1973. Dynamic changes in acid mucopolysaccharides during mineralization of the mandibular condylar cartilage. *Histochemie*, 36:185-192.

SILVER, D., MILLER, J., HARRISON, R., PROCKOP, D.J., 1992. Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:9860-9864.

SINEX, F.M., 1968. The role of collagen in aging. In: *Treatise on collagen*. Acad. Press, New York, 2B:409-448.

SINGH, R., BARDEN, A., MORI, T., BEILIN, L., 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44:129-146.

SODERSTROM, K.O., 1987. Lectin binding to collagen strands in histologic tissue sections. *Histochemistry*, 87:557-560.

STEIN, R.S. & NORRIS, H., 1956. The X-ray diffraction, birefringence and infrared dichroism of stretched polyethylene. *J. Polymer. Sci.*, 21:381-396.

TAYLOR, E.W. & CRAMER, W., 1963. Birefringence of protein solutions and biological systems-II. Studies on TMV tropocollagen and paramyosin. *Biophys. J.*, 3:143-154.

TOEPFER, K., 1970. *Die Thiazinfarbstoffe*. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.

TRESTALD, R.L., SILVER, F.H., 1985. Matrix assembly. In: Hay, E.D., ed. Cell biology of extracellular matrix. New York and London: Plenum Press, 179-215.

VARANI, J., SPEARMAN, D., PERONE, P., FLIGIEL, S.E., DATTA, S.C., WANG, Z.Q., SHAO, S., FISHER, G.J., VOORHEES, J.J., 2001. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.*, 158:931-942.

VEIS, A., 1967. Intact collagen. In: Treatise on Collagen Ramachandran, G.N. (Eds.), 1:380-381.

VIDAL, B.C., 1963. Pleochroism in tendon and its bearing to acid mucopolysaccharides. *Protoplasma*, 56:529-536.

VIDAL, B.C., 1964. The part played by the mucopolysaccharides in the form birefringence of collagen. *Protoplasma*, 59:472-479.

VIDAL, B.C., 1966. Macromolecular disorientation in detached tendons. *Protoplasma*, 62:121-132.

VIDAL, B.C., 1967., Desorganização macromolecular dos feixes de colágeno sob a influência da histamina – estudo experimental. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Campinas, para concorrer ao Cargo de Professor Titular da Cadeira de Patologia.

VIDAL, B.C., 1969. Collagen bundle regulation and control (Biocybernetics). *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 2:356-359.

VIDAL, B.C., 1970, Interferometric and histochemical investigation on collagen bundles: refractive indices and dry masses prior and after staining with orange G. *Ann. Histochem.*, 15:191-205.

VIDAL, B.C., 1977. Acid glycosaminoclycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. *Cell. Mol. Biol.*, 22:45-64.

VIDAL, B.C., 1980. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell. Moll. Biol.*, 26:415-421.

VIDAL, B.C., 1984. Orden molecular y haces de colageno. In: *Trabajos del Instituto Cajal*. LXXV. pp.19-27.

VIDAL, B.C., 1986. Evaluation of carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell. Mol. Biol.*, 32: 527–535.

VIDAL, B.C., Métodos em Biologia Celular. In: VIDAL, B.C & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro. Atheneu, 1987. 348p. pp.05-34.

VIDAL, B.C., 1994. Cell and extracellular matrix interaction: a feed back theory based on molecular order recognition-adhesion events. *Rev. Fac. Ciênc. Médicas/UNICAMP*, 4:1-11.

VIDAL, B.C., 1995a. Crimp as part of a helical structure. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 318:173–178.

VIDAL, B.C., 1995b. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 318:831–836.

VIDAL, B.C., 2003. Image analysis of linear dichroism in collagen-nano-silver complexes. *Microscopy and Analysis (UK)*, pp.21-23.

VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 1970. Absorption spectral curves of dichroism on collagen bundles. *Histochemie*, 23:176-179.

- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 1984. Proteoglycan arrangement in tendon collagen bundles. *Cell. Mol. Biol.*, 30(3):195-204
- VIDAL, B.C. & VILARTA, R., 1988. Articular cartilage: collagen II-proteoglycan interactions. Availability of reactive groups. Variations in birefringence and differences as compared to collagen I. *Acta Histochem.*, 83:189-205.
- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 1989. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes in vitro. *Acta. Histochem. Cytochem.*, 22(4):471-477.
- VIDAL, B.C., BARBISAN, L.F., MARIA, S.S., RUSSO, J. and MELLO, M.L.S., 1996. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. *Apoptosis*, 1:218-221.
- VIDAL, B.C., RUSSO, J., MELLO, M.L.S., 1998. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. *Exp. Cell. Res.*, 244:77-82.
- VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S., 2001. Chirality and helicity of poly-L-benzyl glutamate in liquid crystal and WLS that mimics collagen helicity in crimp. *Mater. Res.*, 4:1969-173.
- VILARTA, R. & VIDAL, B.C., 1990. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregational and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*, 9:55-61.
- VINEY, C., DONALD, A.M., WINDLE, A.H., 1983. Optical microscopy of banded structures in oriented thermotropic polymers. *J. Mater. Sci.*, 18: 1136-1142.
- VLASSARA, H., 1994. Recent progress on the biological and clinical significance of advanced glycosylation endproducts. *J. Lab. Clin. Med.*, 124:19-30.

WALLET, F., GÉRARD, H., MARTIN, P.M., DUSSERT, C., 1996. Toward a new method to *in situ* study of apoptosis and its relations with cell cycle. *Cytometry*, 25:263-270.

WANG, E., 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress Bcl2 is involved. *Cancer Res.*, 55:2284-2292.

WANG, H., LAYTON, B.E., SASTRY, A.M., 2003. Nerve collagens diabetic and nondiabetic Sprague-Dawley and biobreeding rats: an atomic force microscopy study. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 19(4):288-298.

WANG, W., BRÉGÈGÈRE, F., SOROKA, Y., KAYAT, A., REDZINIAK, G., MILNER, Y., 2004. Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125:237-249.

WESS, T.J., WESS, L., MILLER, A., LINDSAY, R.M., BAIRD, J.D., 1993. The *in vivo* glycation of diabetic tendon collagen studied by neutron diffraction. *J. Mol. Biol.*, 230:1297-1303.

WHITESIDES, G. & GRZYBOWSKY, B., 2002. Self-assembly at all scale. *Science*, 295:24180-24210.

WIENER, 1912. *Abhandlungen Sächs Ges. D. Wiss., Math. Phys Kc*, 32:509.

WILMINK, J., WILSON, A.M., GOODSHIP, A.E., 1992. Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibers in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res. Vet. Sci.*, 53:354-359.

WHITTAKER, P., BOUHNER, D.R., PERKINS, D.G., CNHAM, P.B., 1987. Quantitative structural analysis of collagen in chordae tendinae and its relation to floppy mitral valves and proteoglycan infiltration. *Br. Heart*, 57:264-269.

YAMADA, K.M. & OLDEN, K., 1978. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275:179-184.

ZHAO, C., YAO, J., MASUDA, H., KISHORE, R., ASAKURA, T., 2003. Structural characterization and artificial fiber formation of *Bombyx mori* silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Wiley Periodicals. Inc.*, 253-259.

ZATECKA Jr, D.S., KADOR, P.F., GARCIA-CASTINÉIRAS, S., LOU, M.F., 2003. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *American Diabetes Association, Inc* 52(4):1022-1042.